

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 12 月 23 日 (23.12.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/110444 A1

(51) 国際特許分類: A61K 31/445, A61P 25/00, G01N 33/50 // C07D 211/32

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/008669

(22) 国際出願日: 2004 年 6 月 14 日 (14.06.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2003-167744 2003 年 6 月 12 日 (12.06.2003) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): エーザイ株式会社 (EISAI CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1128088 東京都文京区小石川 4 丁目 6 番 10 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 赤祖父 盛 (AKA-SOFU, Shigeru) [JP/JP]; 〒3002635 茨城県つくば市東光台 5 丁目 1 番地 3 エーザイ株式会社 筑波研究所内 Ibaraki (JP). 木村 真奈美 (KIMURA, Manami) [JP/JP]; 〒3002635 茨城県つくば市東光台 5 丁目 1 番地 3 エーザイ株式会社 筑波研究所内 Ibaraki (JP).

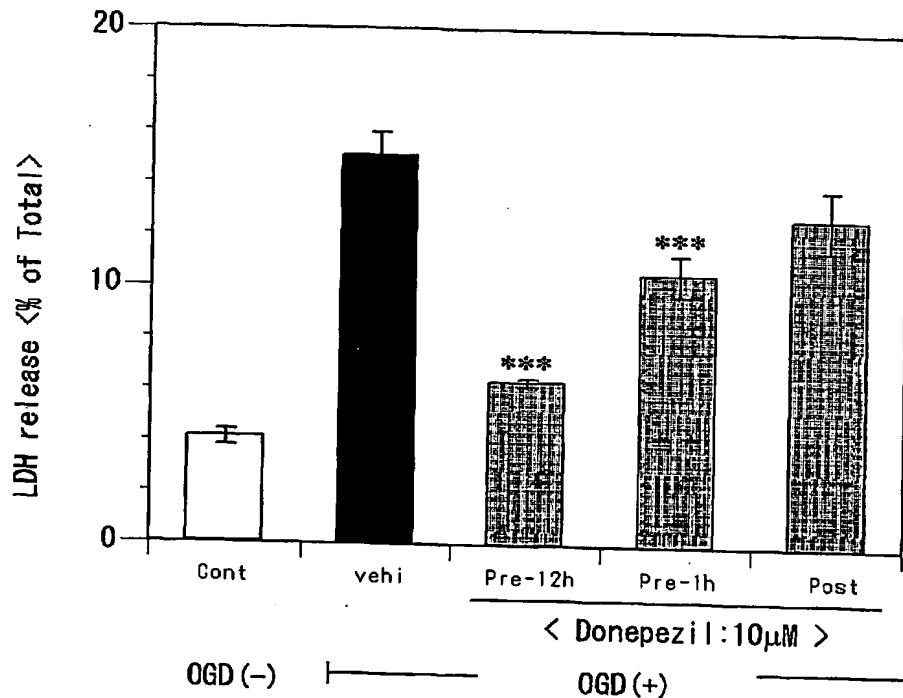
(74) 代理人: 小林 浩, 外 (KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒1040028 東京都中央区八重洲二丁目 8 番 7 号 福岡ビル 9 階 阿部・井窪・片山法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,

(続葉有)

(54) Title: NEUROCYTE PROTECTIVE AGENT

(54) 発明の名称: 神経細胞保護剤



(57) Abstract: A protective agent for central nerve neurocytes, or preventive and/or therapeutic agent for central nerve system neurocyte disorder, comprising a compound whose representative is donepezil hydrochloride.

(57) 要約: 本発明は、塩酸ドネペジルに代表される化合物を含有する、中枢神経の神経細胞保護剤、並びに中枢神経系の神経細胞障害の予防剤及び／又は治療剤に関する。

BEST AVAILABLE COPY

WO 2004/110444 A1



SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,
TD, TG).

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF,

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明 細 書

神経細胞保護剤

5 技術分野

本発明は、塩酸ドネペジルを含有する神経細胞保護剤に関する。

背景技術

塩酸ドネペジルは、アセチルコリンを分解する酵素であるアセチルコリンエステラーゼを可逆的に阻害することにより脳内のアセチルコリンの量を増加させ、
10 脳内コリン作動性神経系を賦活する物質である。この物質は、アルツハイマー型
老年性痴呆、アルツハイマー病の治療薬として広く用いられており（特許第25
78475号公報）、塩酸ドネペジルに関して様々な研究機関で研究されている。
Jin Zhou らは、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤がラットPC12細胞（腫瘍
15 細胞）の虚血様細胞傷害に対して保護的な効果があるという旨の論文を発表して
おり、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤の一例として塩酸ドネペジルを用いて
いる（Zhou, J., Fu, Y., Tang, X. C., 2001. Huperzine A and donepezil protect
rat pheochromocytoma cells against oxygen-glucose deprivation. Neurosci.
Lett. 306, 53-56）。

20 しかしながら、塩酸ドネペジルの神経細胞傷害に対する保護効果の詳細は明らかではない。

前記文献で用いられているPC12細胞とは、褐色細胞腫であり、好クロム性
細胞腫ともいい、副腎髄質あるいは交感神経節細胞などクロム親和性細胞から発
生するカテコールアミン産生腫瘍である。そのため、PC12細胞は脳神経細胞
25 ではなく、細胞間にシナプスを形成しておらず、また興奮性物質に反応する機能
も有していないことが知られている（Sucher, N. J, 1993. Expression of
Endogenous NMDAR1 Transcripts without Receptor Protein Suggests
Post-transcriptional Control in PC12 Cells. The journal of Biological

Chemistry. Vol. 268, No. 30, 22299-22304.)。つまり、前記文献では、癌化した細胞についての検討がなされているのみであり、新たに脳神経細胞より調製された初代培養神経細胞を用いた検討は一切なされていない。従って、塩酸ドネペ

5 は未だに知られていなかった。

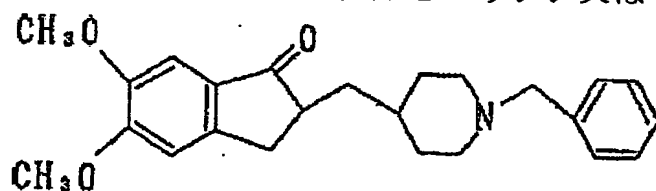
発明の開示

本発明は、神経細胞（中でも中枢神経系の神経細胞）を保護する薬剤を提供することを目的とする。

10 本発明者は、上記課題を解決するため鋭意検討した結果、意外にも塩酸ドネペジルが神経細胞（中でも中枢神経系の神経細胞）を保護する作用を有することを見出し、本発明を完成するに至った。即ち、本発明は以下の通りである。

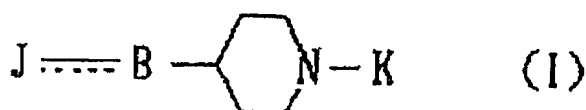
（１）以下の(i)～(vii)で表されるいずれかの化合物を含有する、中枢神経系の神経細胞保護剤（特開平 1-79151 号公報に記載の化合物を包含する）。これらの化合物の塩は、塩酸塩であることが好ましい。

(i) 下記化学式で表される 1-ベンジル-4-〔(5,6-ジメトキシ-1-インダノン)-2-イル〕メチルピペリジン又はその薬理学的に許容できる塩。

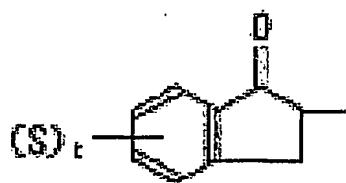


（特許 2578475 号請求項（以下、「cl.」とする。） 1）

20 (ii) 次の一般式（I）で表される環状アミン誘導体又はその薬理学的に許容できる塩。



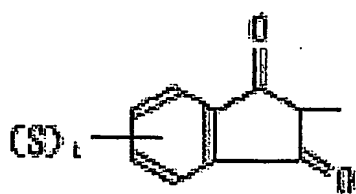
〔式中、J は下記式



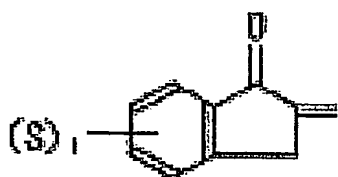
インダノニル



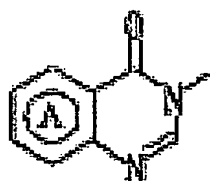
インデニル



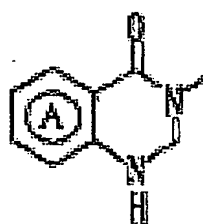
インダンジオニル



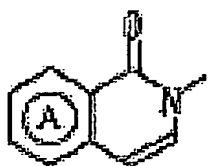
インダノリデニル



(a)



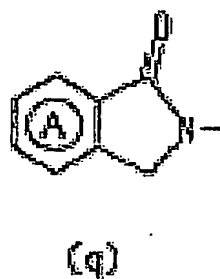
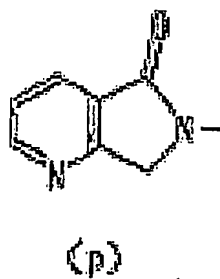
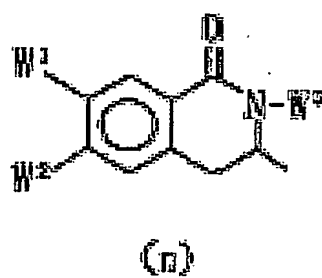
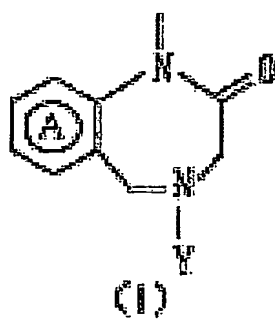
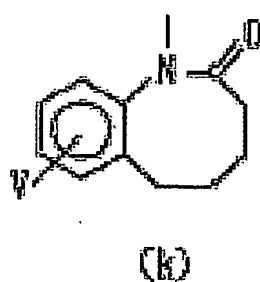
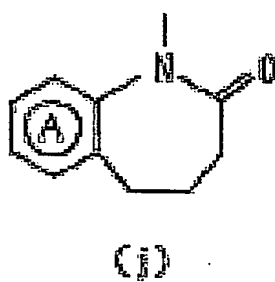
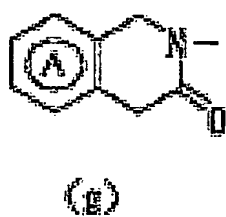
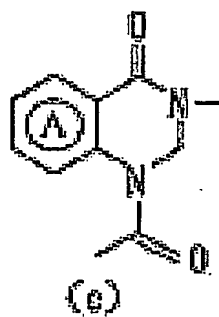
(b)



(c)



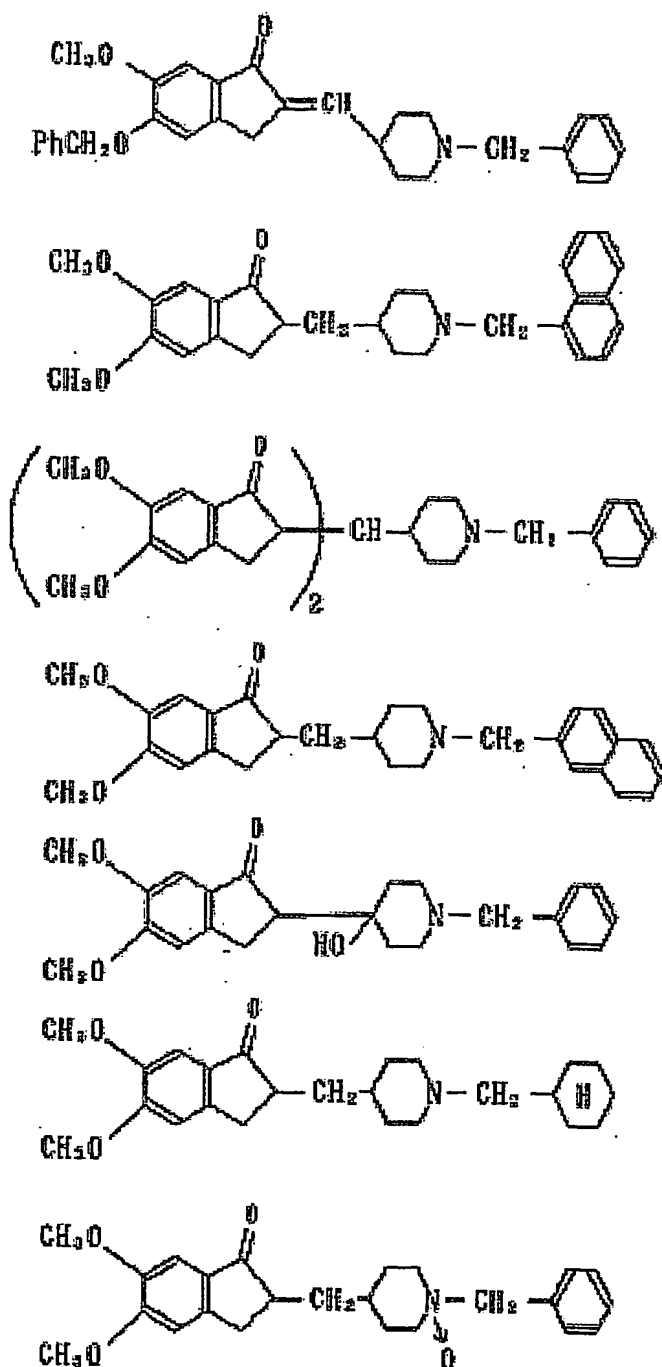
(d)



(式中、S は炭素数 1 ～ 6 の低級アルキル基、炭素数 1 ～ 6 の低級アルコキシ基、ハロゲン原子又は水酸基を意味する。t は 0 又は 1 ～ 4 の整数を意味する。更に (S)_t は結合しているフェニル環の隣りあう炭素間でメチレンジオキシ基又はエチレンジオキシ基を形成していてもよい。式(l) における Y は水素原子又は炭素数 1 ～ 6 の低級アルキル基を意味し、式(k) における V は水素原子又は炭素数 1 ～ 6 の低級アルコキシ基、式(n) における W¹ 及び W² は互いに独立し、同一又は異なって、水素原子、炭素数 1 ～ 6 の低級アルキル基又は炭素数 1 ～ 6 の低級アルコキシ基、W³ は水素原子又は炭素数 1 ～ 6 の低級アルキル基を意味する。式 (a) ～(e), (g), (j), (l) 及び(q) におけるフェニル環 A は炭素数 1 ～ 6 のアルキル基又は炭素数 1 ～ 6 のアルコキシ基によって置換されていてもよい。) で表される基から選択された一価又は二価の基を意味する。B は式 $-(CHR^2)_n-$ (式中、n は 0 又は 1 ～ 10 の整数、R² はそれぞれ独立に水素原子又はメチル基を意味する) で示される基、式 $=(CH-CH=CH)_b-$ (式中、b は 1 ～ 3 の整数を意味する) で示される基、式 $=CH-(CH_2)_c-$ (式中、c は 0 又は 1 ～ 9 の整数を意味する) で示される基、又は式 $=(CH-CH)_d=$ (式中、d は 0 又は 1 ～ 5 の整数を意味する) で示される基を意味する。K は置換基として、ハロゲン化されていてもよい炭素数 1 ～ 6 のアルキル基、炭素数 1 ～ 6 のアルコキシ基、ニトロ基、ハロゲン原子、カルボキシル基、ベンジルオキシ基、炭素数 1 ～ 6 のアルコキシカルボニル基、アミノ基、炭素数 1 ～ 6 のモノアルキルアミノ基、炭素数 1 ～ 6 のジアルキルアミノ基、カルバモイル基、炭素数 1 ～ 6 のアシルアミノ基、シクロヘキシルオキシカルボニル基、炭素数 1 ～ 6 のアルキルアミノカルボニル基、炭素数 1 ～ 6 のアルキルカルボニルオキシ基、水酸基、ホルミル基又はアルコキシ (炭素数 1 ～ 6) アルキル (炭素数 1 ～ 6) 基を有していてもよいフェニルアルキル基を意味する。

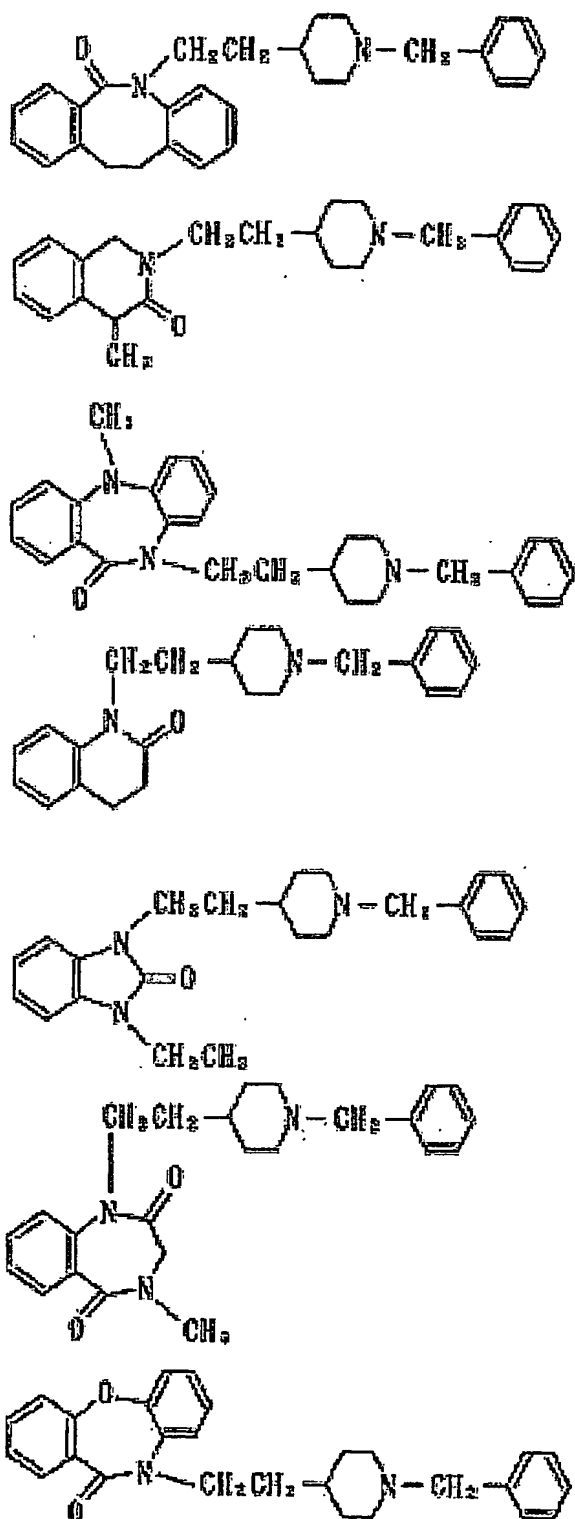
25 \equiv は単結合もしくは二重結合を意味する。

(iii) 下記式で表される化合物群から選択される環状アミン誘導体又はその薬理学的に許容できる塩。



(特許 2733203 号 cl.7)

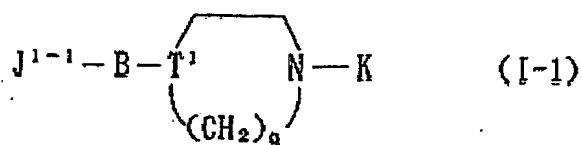
(iv) 下記式で表される化合物群から選択される環状アミン誘導体又はその薬理的に許容できる塩。



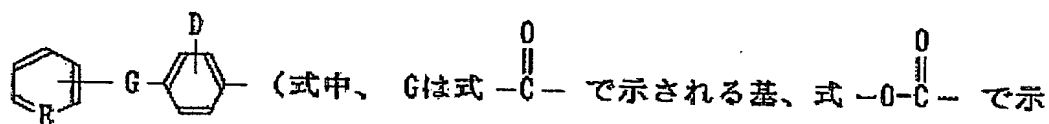
(特許 2733203 号 cl.8)

(v) 次の一般式(I-1) で表される環状アミン誘導体又はその薬理学的に許容でき

る塩。



- 〔式中、 J^{1-1} は炭素数 1～6 の低級アルキル基（以下単に低級アルキル基という）；シクロヘキシル基；置換基として低級アルキル基、炭素数 1～6 の低級アルコキシ基（以下単に低級アルコキシ基という）、ニトロ基、ハロゲン、カルボキシル基、低級アルコキシカルボニル基、アミノ基、モノ低級アルキルアミノ基、ジ低級アルキルアミノ基、カルバモイル基、炭素数 1～6 の脂肪族飽和モノカルボン酸から誘導されるアシルアミノ基、シクロヘキシルオキシカルボニル基、低級アルキルアミノカルボニル基、低級アルキルカルボニルオキシ基、ハロゲン化低級アルキル基、水酸基、ホルミル基又は低級アルコキシ低級アルキル基を有していてもよいフェニル基、ピリジル基あるいはピラジル基；式

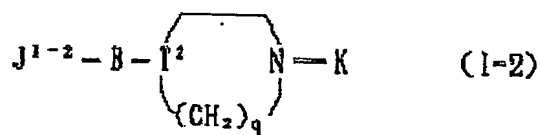


される基、式 $-\text{O}-$ で示される基、式 $-\text{CH}_2-\text{NH}-\begin{array}{c} \text{O} \\ || \\ \text{C}- \end{array}$ で示される基、式 $-\text{CH}_2-\text{O}-$ で示される基、式 $-\text{CH}_2-\text{SO}_2-$ で示される基、式 $-\text{CH}-\begin{array}{c} \text{O} \\ || \\ \text{OH} \end{array}$ で示される基又は式 $-\text{CH}_2-\begin{array}{c} \text{O} \\ \uparrow \\ \text{S}- \end{array}$ で示される基を意味する。B は炭素原子又は窒素原子を意味する。)

- で示される基；キノリル基；キノキサリル基；フリル基又は式 $\text{R}^1-\text{CH}=\text{CH}-$ （式中、 R^1 は水素原子又は低級アルコキシカルボニル基を意味する）で示される基を意味する。B は式 $-(\text{CH}_2)_n-$ で示される基、式 $-\text{NR}^2-(\text{CH}_2)_n-$ （式中、 R^2 は水素原子、低級アルキル基、フェニル基又は低級アルキルスルホニル基を意味する）で示される基、式 $-\text{CONR}^3-(\text{CH}_2)_n-$ （式中、 R^3 は水素原子、低級アルキル基、置換基として低級アルキル基、低級アルコキシ基、ハロゲン又は水酸基を有してもよいフェニル基、ベンジル基又はピリジル基を意味する）で示される基、式

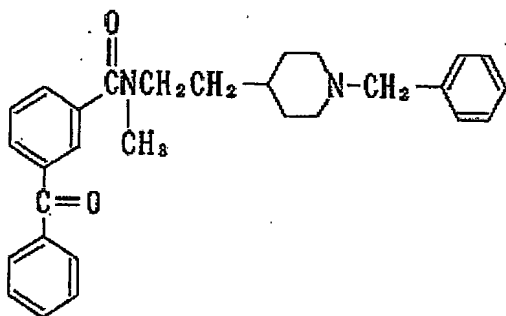
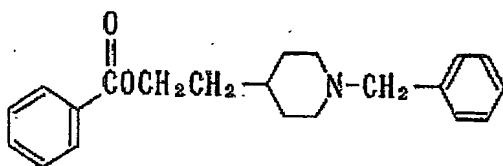
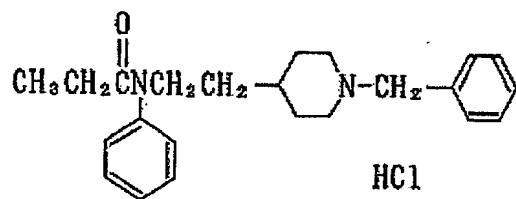
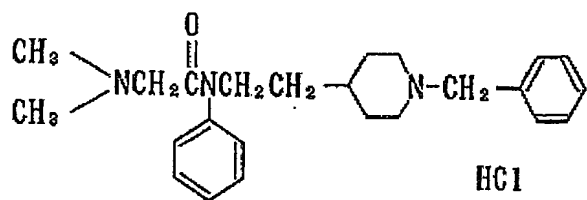
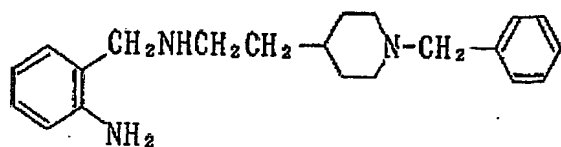
- $\cdot\text{NH}\cdot\text{CO}\cdot(\text{CH}_2)_n\cdot$ で示される基、式 $\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CO}\cdot\text{NH}\cdot(\text{CH}_2)_n\cdot$ で示される基、式 $\cdot\text{CO}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CH}(\text{OH})\cdot\text{CH}_2\cdot$ で示される基、式 $\cdot\text{CO}\cdot(\text{CH}_2)_n\cdot$ で示される基、式 $\cdot\text{C}(\text{OH})\cdot(\text{CH}_2)_n\cdot$ で示される基又は式 $\cdot\text{CO}\cdot\text{CH}=\text{CH}\cdot\text{CH}_2\cdot$ で示される基（以上の式中、 n は 0 又は 1～10 の整数を意味する）を意味する。 T^1 は炭素原子を意味する。 K はフェニル基が置換基として低級アルキル基、低級アルコキシ基、ニトロ基、ハロゲン、カルボキシ基、低級アルコキシカルボニル基、アミノ基、モノ低級アルキルアミノ基、ジ低級アルキルアミノ基、カルバモイル基、炭素数 1～6 の脂肪族飽和モノカルボン酸から誘導されるアシルアミノ基、シクロヘキシルオキシカルボニル基、低級アルキルアミノカルボニル基、低級アルキルカルボニルオキシ基、ハロゲン化低級アルキル基、水酸基、ホルミル基又は低級アルコキシ低級アルキル基を有していてもよいフェニルアルキル（アルキルの炭素数 1～2）基；シンナミル基；低級アルキル基；ピリジルメチル基；シクロアルキル（シクロアルキルの炭素数 3～6）アルキル基；アダマンタンメチル基；フルフリル基；炭素数 3～6 のシクロアルキル基又はアシル基を意味する。 q は 1 又は 2 を意味する。（特許 3078244 号 cl.1）

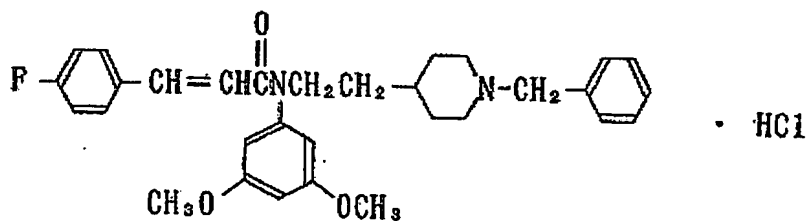
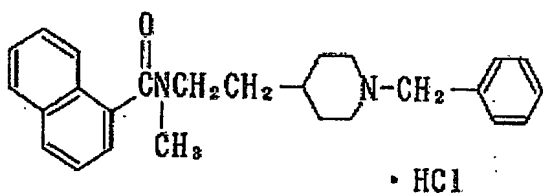
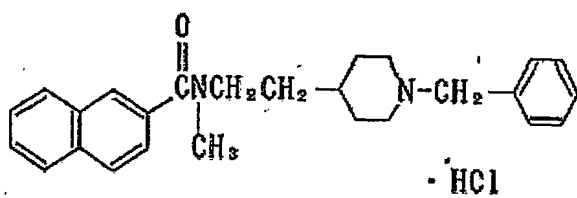
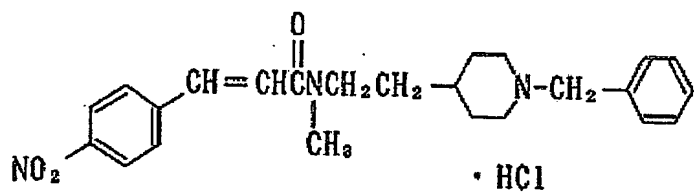
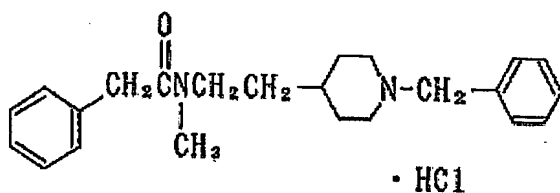
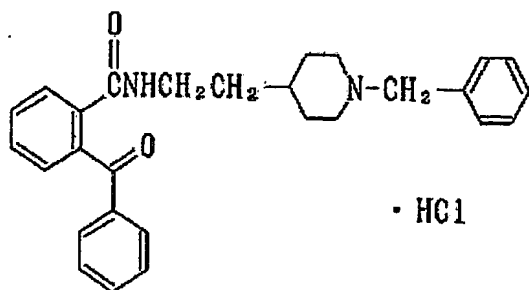
(vi) 次の一般式(I-2) で表される環状アミン誘導体又はその薬理学的に許容できる塩。



- 20 [式中、 J^{1-2} は置換基として炭素数 1～6 の低級アルキル基又は炭素数 1～6 の低級アルコキシ基を有していてもよいインダノニル基を意味する。 T^2 は窒素原子を意味する。 B , K 及び q は前記の意味を有する。]（特許 3078244 号 cl.2）

(vii) 下記式で表される化合物群から選択される環状アミン誘導体又はその薬理学的に許容できる塩。

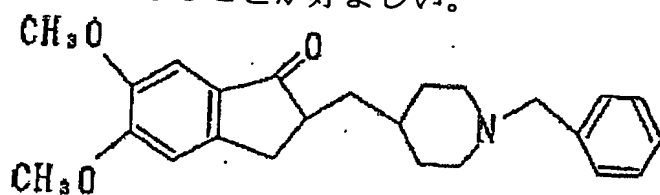




(特許 3078244 号 cl.4)

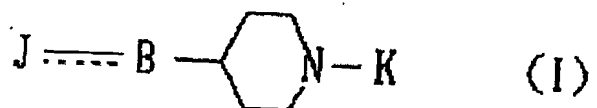
- (2) 以下の(i)~(vii)で表されるいずれかの化合物を含有する、中枢神経系の神経細胞障害の予防剤及び／又は治療剤。

(i) 下記化学式で表される 1-ペンジル-4-[(5,6-ジメトキシ-1-インドノン)-2-イル]メチルピペリジン又はその薬理学的に許容できる塩。塩は、塩酸塩であることが好ましい。

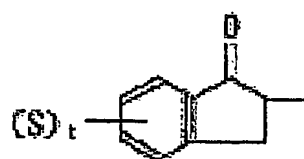


5 (特許 2578475 号 cl.1)

(ii) 次の一般式 (I) で表される環状アミン誘導体又はその薬理学的に許容できる塩。



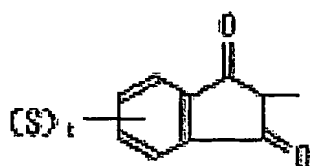
[式中、J は下記式



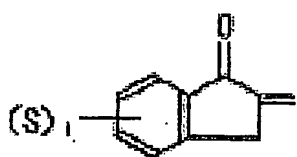
インダノニル



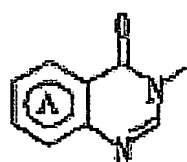
インデニル



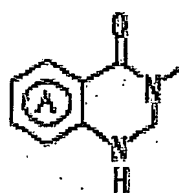
インダンジオニル



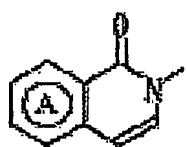
インダノリデニル



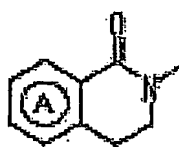
(a)



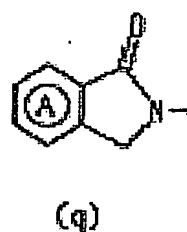
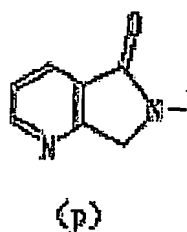
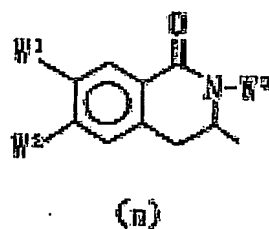
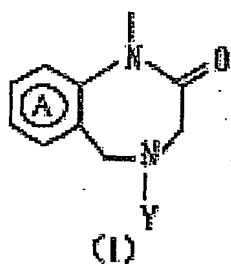
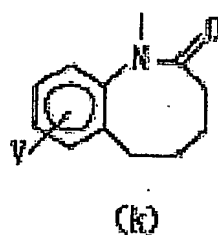
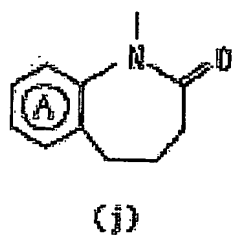
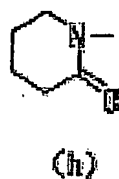
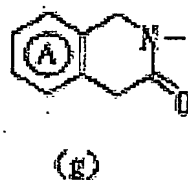
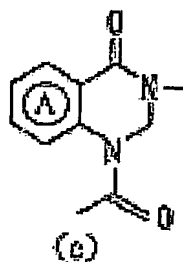
(b)



(c)



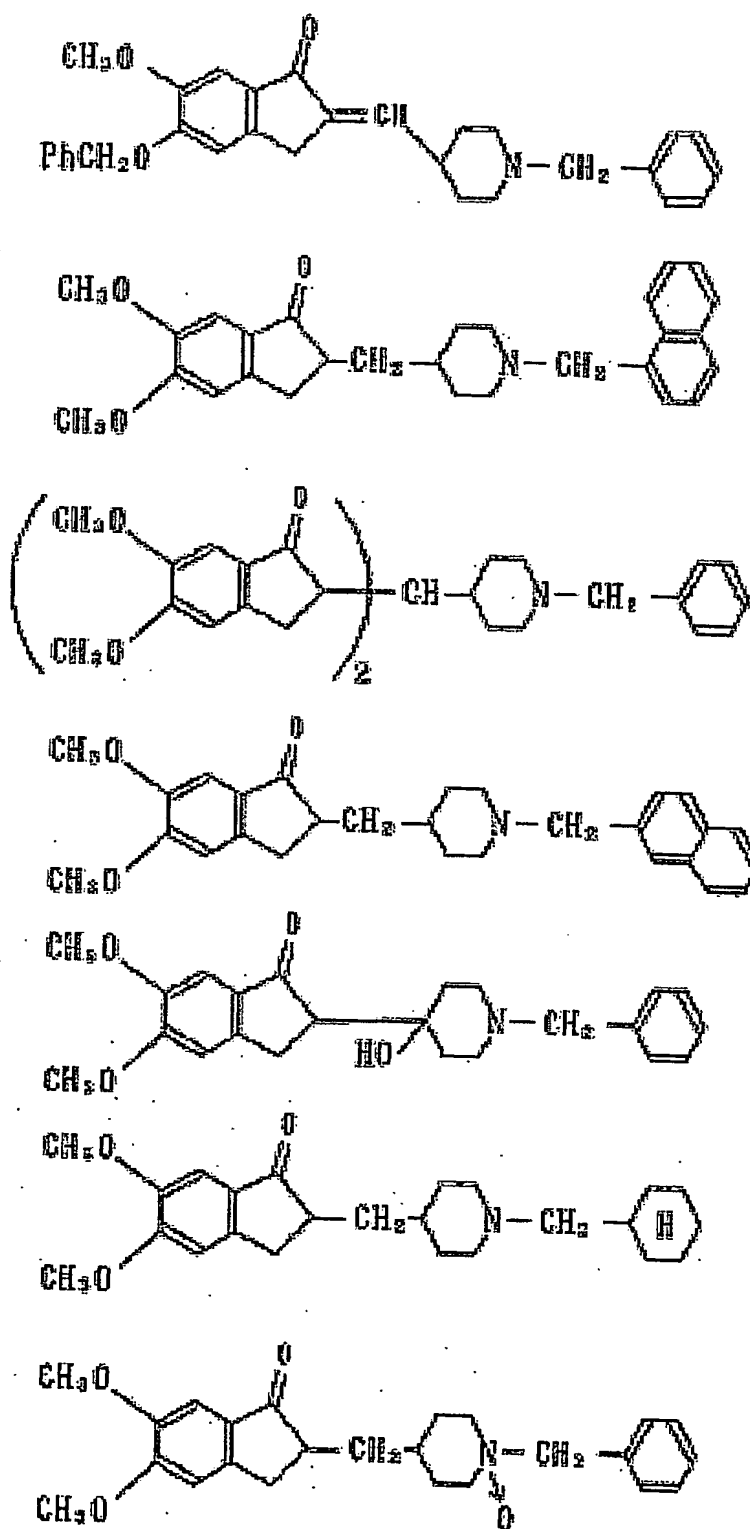
(d)



(式中、S は炭素数 1～6 の低級アルキル基、炭素数 1～6 の低級アルコキシ基、ハロゲン原子又は水酸基を意味する。t は 0 又は 1～4 の整数を意味する。更に (S)_t は結合しているフェニル環の隣りあう炭素間でメチレンジオキシ基又はエチレンジオキシ基を形成していてもよい。式(l) における Y は水素原子又は炭素数

1～6の低級アルキル基を意味し、式(k)におけるVは水素原子又は炭素数1～6の低級アルコキシ基、式(n)におけるW¹及びW²は互いに独立し、同一又は異なって、水素原子、炭素数1～6の低級アルキル基又は炭素数1～6の低級アルコキシ基、W³は水素原子又は炭素数1～6の低級アルキル基を意味する。式(a)～(e), (g), (j), (l)及び(q)におけるフェニル環Aは炭素数1～6のアルキル基又は炭素数1～6のアルコキシ基によって置換されていてもよい。)で表される基から選択された一価又は二価の基を意味する。Bは式-(CHR²)_n- (式中、nは0又は1～10の整数、R²はそれぞれ独立に水素原子又はメチル基を意味する)で示される基、式=(CH-CH=CH)_b- (式中、bは1～3の整数を意味する)で示される基、式=CH-(CH₂)_c- (式中、cは0又は1～9の整数を意味する)で示される基、又は式=(CH-CH)_d= (式中、dは0又は1～5の整数を意味する)で示される基を意味する。Kは置換基として、ハロゲン化されていてもよい炭素数1～6のアルキル基、炭素数1～6のアルコキシ基、ニトロ基、ハロゲン原子、カルボキシル基、ベンジルオキシ基、炭素数1～6のアルコキシカルボニル基、アミノ基、炭素数1～6のモノアルキルアミノ基、炭素数1～6のジアルキルアミノ基、カルバモイル基、炭素数1～6のアシルアミノ基、シクロヘキシルオキシカルボニル基、炭素数1～6のアルキルアミノカルボニル基、炭素数1～6のアルキルカルボニルオキシ基、水酸基、ホルミル基又はアルコキシ(炭素数1～6)アルキル(炭素数1～6)基を有していてもよいフェニルアルキル基を意味する。

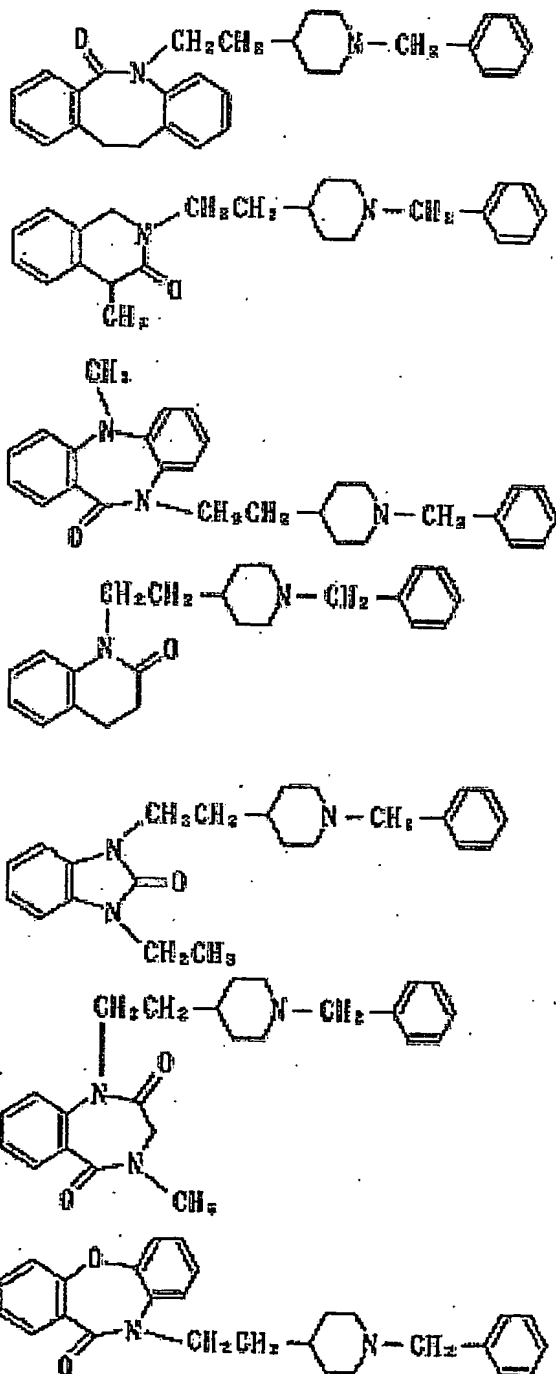
は単結合もしくは二重結合を意味する。(特許2733203号cl.1)
(iii) 下記式で表される化合物群から選択される環状アミン誘導体又はその薬理学的に許容できる塩。



(特許 2733203 号 cl.7)

(iv) 下記式で表される化合物群から選択される環状アミン誘導体又はその薬理

学的に許容できる塩。

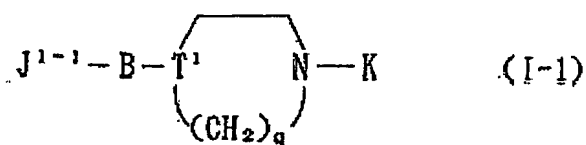


(特許 2733203 号 c1.8)

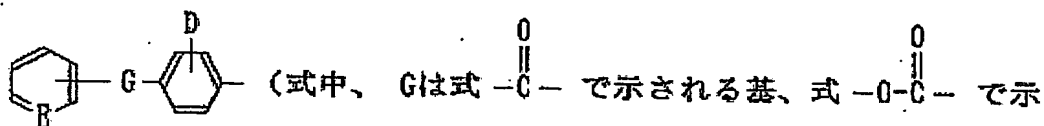
5

(v) 次の一般式(I-1) で表される環状アミン誘導体又はその薬理学的に許容でき

る塩。



- 〔式中、J¹⁻¹ は炭素数 1 ～ 6 の低級アルキル基（以下単に低級アルキル基という）；シクロヘキシル基；置換基として低級アルキル基、炭素数 1 ～ 6 の低級アルコキシ基（以下単に低級アルコキシ基という）、ニトロ基、ハロゲン、カルボキシル基、低級アルコキシカルボニル基、アミノ基、モノ低級アルキルアミノ基、ジ低級アルキルアミノ基、カルバモイル基、炭素数 1 ～ 6 の脂肪族飽和モノカルボン酸から誘導されるアシルアミノ基、シクロヘキシルオキシカルボニル基、低級アルキルアミノカルボニル基、低級アルキルカルボニルオキシ基、ハロゲン化低級アルキル基、水酸基、ホルミル基又は低級アルコキシ低級アルキル基を有していてもよいフェニル基、ピリジル基あるいはピラジル基；式

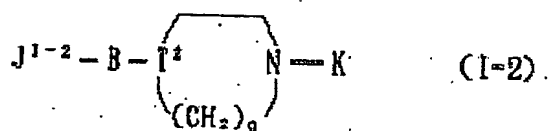


される基、式 $-O-$ で示される基、式 $-CH_2-NH-\begin{array}{c} O \\ || \\ C- \end{array}$ で示される基、式 $-CH_2-O-$ で示される基、式 $-CH_2-SO_2-$ で示される基、式 $\begin{array}{c} O \\ || \\ -CH- \\ | \\ OH \end{array}$ で示される基又は式 $\begin{array}{c} O \\ \uparrow \\ -CH_2-S- \end{array}$ で示される基を意味する。B は炭素原子又は窒素原子を意味する。）

- で示される基；キノリル基；キノキサリル基；フリル基又は式 $R^1-CH=CH-$ （式中、R¹ は水素原子又は低級アルコキシカルボニル基を意味する）で示される基を意味する。B は式 $-(CH_2)_n-$ で示される基、式 $-NR^2-(CH_2)_n-$ （式中、R² は水素原子、低級アルキル基、フェニル基又は低級アルキルスルホニル基を意味する）で示される基、式 $-CONR^3-(CH_2)_n-$ （式中、R³ は水素原子、低級アルキル基、置換基として低級アルキル基、低級アルコキシ基、ハロゲン又は水酸基を有してもよいフェニル基、ベンジル基又はピリジル基を意味する）で示される基、式

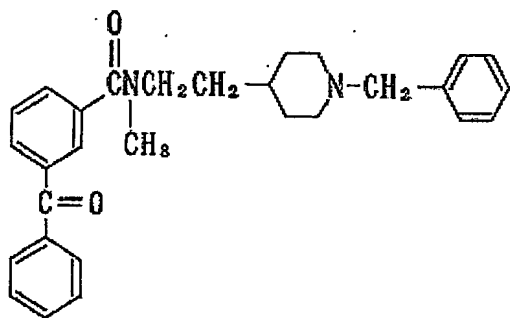
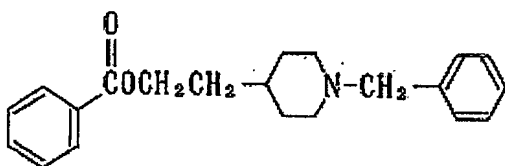
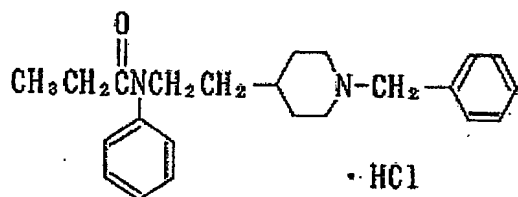
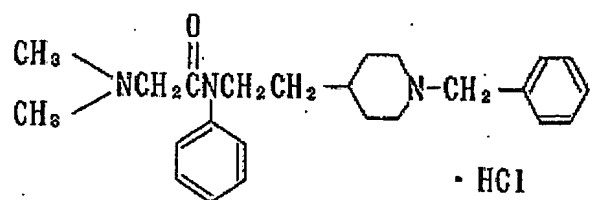
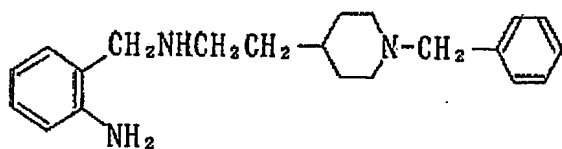
- $\text{-NH-CO-(CH}_2\text{)}_n\text{-}$ で示される基、式 $\text{-CH}_2\text{-CO-NH-(CH}_2\text{)}_n\text{-}$ で示される基、式 $\text{-CO-CH}_2\text{-CH(OH)-CH}_2\text{-}$ で示される基、式 $\text{-CO-(CH}_2\text{)}_n\text{-}$ で示される基、式 $\text{-C(OH)-(CH}_2\text{)}_n\text{-}$ で示される基又は式 $\text{-CO-CH=CH-CH}_2\text{-}$ で示される基（以上の式中、 n は 0 又は 1 ~ 10 の整数を意味する）を意味する。 T^1 は炭素原子を意味する。 K はフェニル基が置換基として低級アルキル基、低級アルコキシ基、ニトロ基、ハロゲン、カルボキシ基、低級アルコキシカルボニル基、アミノ基、モノ低級アルキルアミノ基、ジ低級アルキルアミノ基、カルバモイル基、炭素数 1 ~ 6 の脂肪族飽和モノカルボン酸から誘導されるアシルアミノ基、シクロヘキシルオキシカルボニル基、低級アルキルアミノカルボニル基、低級アルキルカルボニルオキシ基、ハロゲン化低級アルキル基、水酸基、ホルミル基又は低級アルコキシ低級アルキル基を有していてもよいフェニルアルキル（アルキルの炭素数 1 ~ 2）基；シンナミル基；低級アルキル基；ピリジルメチル基；シクロアルキル（シクロアルキルの炭素数 3 ~ 6）アルキル基；アダマンタンメチル基；フルフリル基；炭素数 3 ~ 6 のシクロアルキル基又はアシル基を意味する。 q は 1 又は 2 を意味する。（特許 3078244 号 cl.1）

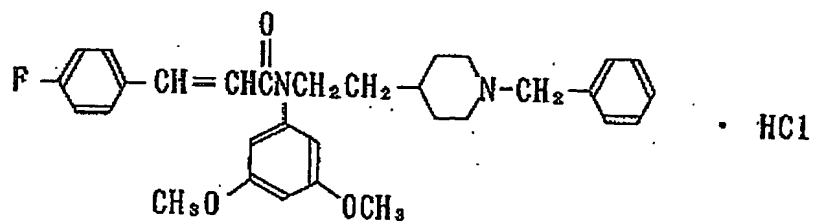
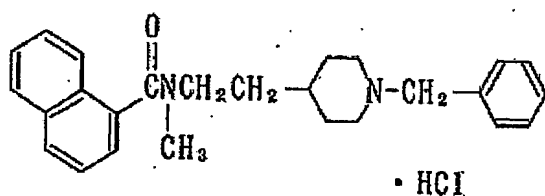
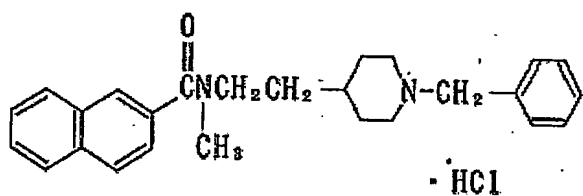
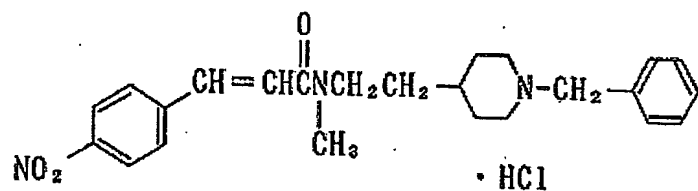
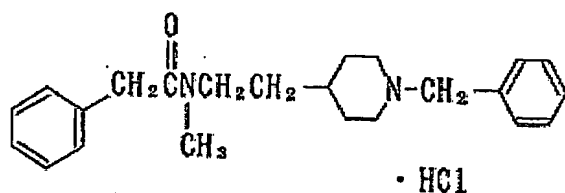
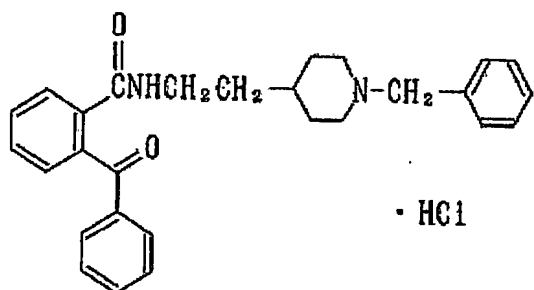
(vi) 次の一般式(I-2) で表される環状アミン誘導体又はその薬理学的に許容できる塩。



- [式中、 J^{1-2} は置換基として炭素数 1 ~ 6 の低級アルキル基又は炭素数 1 ~ 6 の低級アルコキシ基を有してもよいインダノニル基を意味する。 T^2 は窒素原子を意味する。 B , K 及び q は前記の意味を有する。]（特許 3078244 号 cl.2）

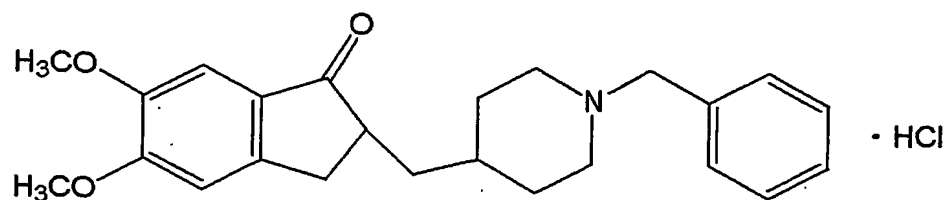
(vii) 下記式で表される化合物群から選択される環状アミン誘導体又はその薬理学的に許容できる塩。





(特許 3078244 号 c1.4)

上記（１）及び（２）において、化合物の塩は、塩酸塩であることが好ましく、特に、下記式に示す塩酸ドネベジルであることが好ましい。



また、上記（２）において、神経細胞障害としては、脳虚血、興奮性毒性または $A\beta$ 毒性によって誘発されるものが挙げられ、前記脳虚血及び興奮性毒性は、
 5 脳卒中、脳梗塞または脳塞栓のいずれかに伴うものが挙げられる。また、前記 $A\beta$ 毒性は、アルツハイマー病又はダウン症に伴うものであってもよい。

上記（１）又は（２）において、細胞は、脳由来の成熟した神経細胞であり、特に、大脳皮質、中隔野及び海馬からなる群から選択されるいずれかに由来するものが挙げられる。また、当該神経細胞は、初代培養細胞であってもよい。

10 （３）上記（１）記載の保護剤、あるいは（２）記載の予防剤及び／又は治療剤を含有する、脳卒中、脳梗塞又は脳塞栓のいずれかの疾病の予後改善剤。

（４）上記（１）記載の保護剤の有効量を患者に投与することを特徴とする、中枢神経系の神経細胞保護方法。

15 （５）上記（２）記載の予防剤及び／又は治療剤の有効量を患者に投与することを特徴とする、中枢神経系の神経細胞障害の予防方法及び／又は治療方法。

上記（５）において、神経細胞障害としては、脳虚血、興奮性毒性または $A\beta$ 毒性によって誘発されるものが挙げられ、前記脳虚血及び興奮性毒性は、脳卒中、
 脳梗塞または脳塞栓のいずれかに伴うものが挙げられる。また、興奮性毒性としては、たとえば NMDA 又はカイニン酸によるものが挙げられる。さらに、前記
 20 $A\beta$ 毒性は、アルツハイマー病又はダウン症に伴うものであってもよい。

（６）上記（３）記載の予後改善剤の有効量を患者に投与することを特徴とする、脳卒中、脳梗塞または脳塞栓のいずれかの疾病の予後改善方法。

（７）上記（１）記載の保護剤、（２）記載の予防剤及び／又は治療剤、並びに
 （３）記載の予後改善剤からなる群から選択されるいずれかの薬剤を製造するた
 25 めの、（１）に示す化合物の使用。

(8) 中枢神経系のコリン作動性神経細胞に、 $A\beta$ 存在下で候補化合物を作用させ、 $A\beta$ 凝集量を検出または測定することを特徴とする、 $A\beta$ 凝集抑制作用を有する化合物またはその薬理学的に許容される塩のスクリーニング方法。

5 本発明のスクリーニング方法は、上記 $A\beta$ 凝集量の検出または測定した結果を用い、上記候補化合物が $A\beta$ 凝集抑制作用を有するか否かを、上記候補化合物の非存在下における $A\beta$ 凝集量と比較することで、目的とする化合物であるか否かを判定することができる。

(9) 上記 (8) 記載の方法に使用するための、 $A\beta$ 凝集抑制作用を有する化合物またはその薬理学的に許容される塩のスクリーニングキット。

10 (10) 中枢神経系のコリン作動性神経細胞に、 $A\beta$ 存在下で候補化合物を作用させ、細胞傷害又は細胞死を検出することを特徴とする、 $A\beta$ 毒性によって誘発される中枢神経系の神経細胞障害の予防及び／又は治療に有効な化合物またはその薬理学的に許容される塩のスクリーニング方法。

15 本発明の方法においては、上記細胞傷害又は細胞死を検出した結果を用いて、上記候補化合物が $A\beta$ 毒性に対する細胞保護作用を有するか否かを、上記候補化合物の非存在下における細胞傷害又は細胞死の程度と比較することで、目的とする化合物であるか否かを判定することができる。

上記の細胞傷害又は細胞死は、乳酸脱水素酵素 (LDH) の濃度測定又は MTT アッセイにより検出できる。

20 (11) 上記 (10) 記載の方法に使用するための、 $A\beta$ 毒性によって誘発される中枢神経系の神経細胞障害の予防及び／又は治療に有効な化合物またはその薬理学的に許容される塩のスクリーニングキット。

図面の簡単な説明

25 図 1 は、酸素グルコース除去 (OGD) 処理の 12 時間前、1 時間前及び OGD 処理の 1 時間後にドネベジルを細胞に添加した場合におけるラット初代培養細胞の LDH の放出を表わすグラフである。OGD(-)は OGD 処理なし、OGD(+)は OGD 処理したものを表す。Cont 及び Vehi は薬剤無投与群である。データは

Dunnett's test で解析した。図 1 の「***」は $P < 0.005$ であることを示す（「vehicle group」を対照とする）。

図 2 は、OGD 処理の有無におけるラット初代培養細胞の形態学的観察を示したものであり、それぞれ A はコントロール、B は OGD 処理を施したもの、C は
5 ドネペジルを 12 時間前から添加した後に OGD 処理を行なったものの状態を表わす顕微鏡写真である。スケールバーは 0.1 mm を示す。

図 3 は、OGD 処理 12 時間前から種々のアセチルコリンエステラーゼ阻害剤を添加した場合とドネペジルとを添加した場合におけるラット初代培養細胞の LDH の放出を表わすグラフである。OGD(-) は OGD 処理なし、OGD(+) は OGD
10 処理したものを表す。Cont 及び Vehi は薬剤無投与群である。データは Dunnett's test で解析した。図 3 の「*」は $P < 0.05$, 「**」は $P < 0.01$, 「***」は $P < 0.005$ であることを示す（「vehicle group」を対照とする）。

図 4 は、OGD 処理 12 時間前からドネペジルとともにスコポラミン (Sco) 又はメカミラミン (Mec) を添加した場合におけるラット初代培養細胞の LDH の
15 放出を表わすグラフである。OGD(-) は OGD 処理なし、OGD(+) は OGD 処理したものを表す。Cont 及び Vehi は薬剤無投与群である。データは ANOVA と Welch's t-test で解析した。図 4 の「*」は $P < 0.05$, 「**」は $P < 0.01$, 「***」は $P < 0.005$ であることを示す（「vehicle group」を対照とする）。

図 5 は、NMDA 処理によるラット初代培養神経細胞の LDH の放出に対するド
20 ネペジルの効果を表わすグラフである。ドネペジルは 12 時間前から加えた。Cont 及び Vehi は薬剤無投与群である。データは Dunnett's test で解析した。図 5 の「***」は $P < 0.005$ であることを示す（「vehicle group」を対照とする）。

図 6 は、カイニン酸処理によるラット初代培養神経細胞の LDH の放出に対するドネペジルの効果を表わすグラフである。ドネペジルは 24 時間前から加えた。
25 Cont 及び Vehi は薬剤無投与群である。データは Dunnett's test で解析した。図 6 の「***」は $P < 0.005$ であることを示す（「vehicle group」を対照とする）。

図 7 は、培養ラット中隔野神経細胞を抗コリンアセチルトランスフェラーゼ抗体で免疫染色した図を示す。

図 8 は、 $A\beta$ (1-40) 毒性に対するドネペジルの保護効果を、LDH を指標に用いて評価した結果を示す図である。

図 9 は、培養ラット中隔野神経細胞を抗 MAP 2 抗体で免疫染色した図を示す。

図 10 は、 $A\beta$ の凝集を CD の変化を指標に用いて測定した結果を示す図である。

5 図 11 は、細胞内アセチルコリン活性に対する siRNA の効果を示す図である。

図 12 は、 $A\beta$ (1-40) 毒性に対する siRNA の保護効果を示す図である。

図 13 は、 $A\beta$ の凝集に対する siRNA の凝集抑制効果を示す図である。

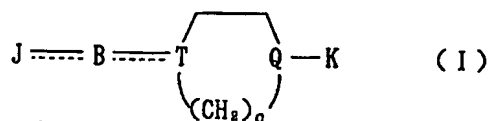
発明を実施するための最良の形態

10 1. 概要

本発明は、以下に表されるいずれかの化合物（以下、「化合物 Q」とする）を含有する、中枢神経系の神経細胞の保護剤、当該神経細胞障害の予防剤及び／又は治療剤である。また、本発明により、予防剤及び／又は治療剤を適用量投与することを特徴とする、中枢神経系の神経細胞の保護方法及び／又は当該神経細胞
15 障害の予防方法及び／若しくは治療方法が提供される。以下、本発明の保護剤、予防剤、治療剤、予後改善剤に使用される化合物 Q を以下に示す。

2. 化合物 Q

次の一般式 (I) で表される環状アミン誘導体及びその薬理学的に許容できる
20 塩（特開平 1-79151 号公報、特開平 07-252216 号公報、特開平 10-067739 号公報を参照）。

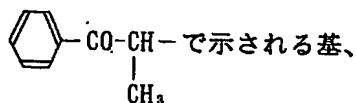


〔式中、

25 J は (a) 置換若しくは無置換の次に示す基；①フェニル基、②ピリジル基、③

ピラジル基、④キノリル基、⑤シクロヘキシル基、⑥キノキサリル基又は⑦フリル基、

(b) フェニル基が置換されていてもよい次の群から選択された一価又は二価の基；①インダニル、②インダノニル、③インデニル、④インデノニル、⑤インダ
5 ンジオニル、⑥テトラロニル、⑦ベンズスベロニル、⑧インダノリル、⑨式

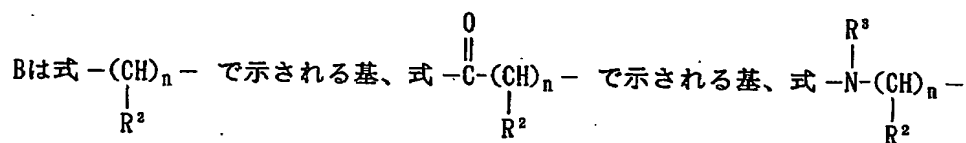


(c) 環状アミド化合物から誘導される一価の基、

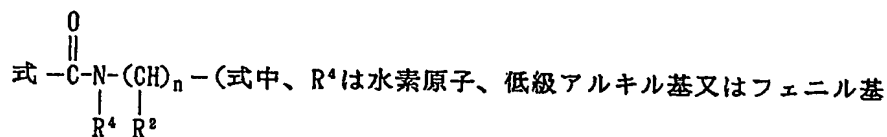
(d) 低級アルキル基、又は

(e) 式 $\text{R}^1\text{-CH=CH-}$ (式中、 R^1 は水素原子又は低級アルコキシカルボニル基
10 を意味する)

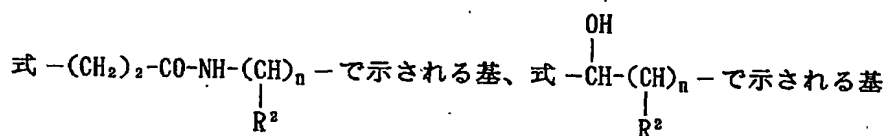
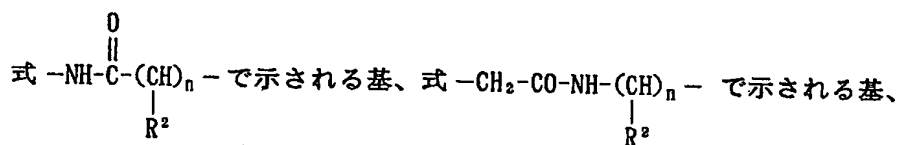
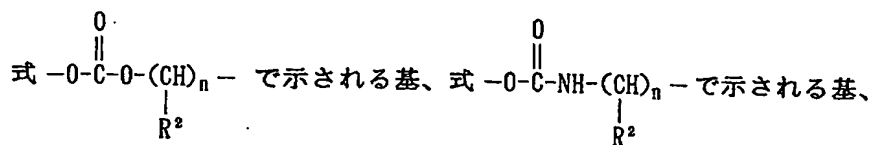
で示される基を意味する。



(式中、 R^3 は水素原子、低級アルキル基、アシル基、低級アルキルスルホニル基、
置換されてもよいフェニル基又はベンジル基を意味する) で示される基、



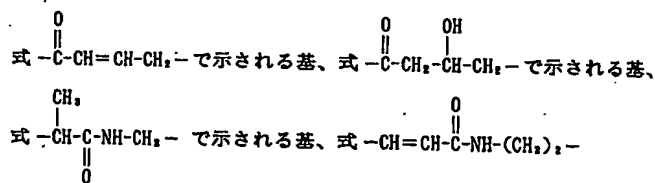
を意味する)で示される基、式 $\begin{array}{c} -\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH})_n- \\ | \\ \text{R}^2 \end{array}$ で示される基、



(以上の式中、 n は0又は1～10の整数を意味する。 R^2 は式 $\begin{array}{c} -(\text{CH})_n- \\ | \\ \text{R}^2 \end{array}$

で示されるアルキレン基が置換基を持たないか、又は1つ又は1つ以上のメチル基を有しているような形で水素原子又はメチル基を意味する。)、式 $\begin{array}{c} =(\text{CH}-\text{CH} \\ =\text{CH})_b- \end{array}$ (式中、 b は1～3の整数を意味する)で示される基、式 $\begin{array}{c} =\text{CH}-(\text{CH}_2)_c- \end{array}$ (式中、 c は0又は1～9の整数を意味する)で示される基、式 $\begin{array}{c} =(\text{CH}-\text{CH})_d \\ = \end{array}$

(式中、 d は0又は1～5の整数を意味する)で示される基、



で示される基、式 $-\text{NH}-$ で示される基、式 $-\text{O}-$ で示される基、式 $-\text{S}-$ で示される基、ジアルキルアミノアルキルカルボニル基又は低級アルコキシカルボニル基を意味する。

Tは窒素原子又は炭素原子を意味する。

Qは窒素原子、炭素原子又は式 $\text{>N}\rightarrow\text{O}$ で示される基を意味する。

K は水素原子、置換若しくは無置換のフェニル基、フェニル基が置換されてもよいアリールアルキル基、フェニル基が置換されてもよいシナミル基、低級アルキル基、ピリジルメチル基、シクロアルキルアルキル基、アダマンタンメチル基、フリルメチル基、シクロアルキル基、低級アルコキシカルボニル基又はアシル基を意味する。

q は 1 ～ 3 の整数を意味する。

式中、 = は単結合もしくは二重結合を意味する。]

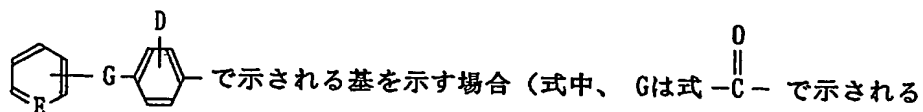
10 化合物 (I) における上記の定義において、J,K,R³,R⁴ にみられる低級アルキル基とは、炭素数 1 ～ 6 の直鎖もしくは分枝状のアルキル基、例えばメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、イソブチル基、sec-ブチル基、tert-ブチル基、ペンチル基 (アミル基)、イソペンチル基、ネオペンチル基、tert-ペンチル基、1-メチルブチル基、2-メチルブチル基、1,2-ジメチルプロピル基、ヘキシル基、イソヘキシル基、1-メチルペンチル基、2-メチルペンチル基、3-メチルペンチル基、1,1-ジメチルブチル基、1,2-ジメチルブチル基、2,2-ジメチルブチル基、1,3-ジメチルブチル基、2,3-ジメチルブチル基、3,3-ジメチルブチル基、1-エチルブチル基、2-エチルブチル基、1,1,2-トリメチルプロピル基、1,2,2-トリメチルプロピル基、1-エチル-1-メチルプロピル基、1-エチル-2-メチルプロピル基などを意味する。

15 これらのうち好ましい基としては、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基などを挙げることができ、最も好ましいものはメチル基である。

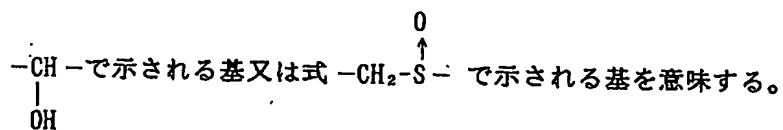
J における「置換もしくは無置換の次に示す基；①フェニル基、②ピリジル基、③ピラジル基、④キノリル基、⑤シクロヘキシル基、⑥キノキサリル基又は⑦フリル基」という定義において、置換基としては、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、イソブチル基、tert-ブチル基などの炭素数 1 ～ 6 の低級アルキル基；メトキシ基、エトキシ基など上記の低級アルキ

- ル基に対応する低級アルコキシ基；ニトロ基；塩素、臭素、フッ素などのハロゲン；カルボキシ基；メトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基、イソプロポキシカルボニル基、*n*-プロポキシカルボニル基、*n*-ブチロキシカルボニル基など、上記の低級アルコキシ基に対応する低級アルコキシカルボニル基；アミノ基；モノ低級アルキルアミノ基；ジ低級アルキルアミノ基；カルバモイル基；アセチルアミノ基、プロピオニルアミノ基、ブチリルアミノ基、イソブチリルアミノ基、バレリルアミノ基、ピバロイルアミノ基など、炭素数1～6の脂肪族飽和モノカルボン酸から誘導されるアシルアミノ基；シクロヘキシルオキシカルボニル基などのシクロアルキルオキシカルボニル基；メチルアミノカルボニル基、エチルアミノカルボニル基などの低級アルキルアミノカルボニル基；メチルカルボニルオキシ基、エチルカルボニルオキシ基、*n*-プロピルカルボニルオキシ基など前記に定義した低級アルキル基に対応する低級アルキルカルボニルオキシ基；トリフルオロメチル基などに代表されるハロゲン化低級アルキル基；水酸基；ホルミル基；エトキシメチル基、メトキシメチル基、メトキシエチル基などの低級アルコキシ低級アルキル基などを挙げることができる。上記の置換基の説明において、「低級アルキル基」、「低級アルコキシ基」とは、前記の定義から派生する基をすべて含むものとする。置換基は同一又は異なる1～3個で置換されていてもよい。

- 更にフェニル基の場合は、次の如き場合も置換されたフェニル基に含まれるものとする。即ち、



基、式 $\text{—}\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}\text{—}$ で示される基、式 —O— で示される基、式 $\text{—CH}_2\text{—NH—}\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}\text{—}$ で示される基、式 $\text{—CH}_2\text{—O—}$ で示される基、式 $\text{—CH}_2\text{—SO}_2\text{—}$ で示される基、式



E は炭素原子又は窒素原子を意味する。

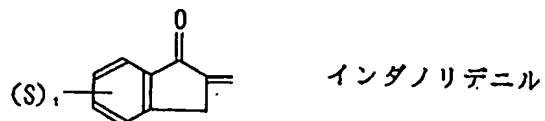
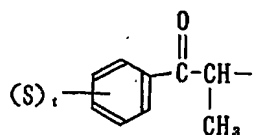
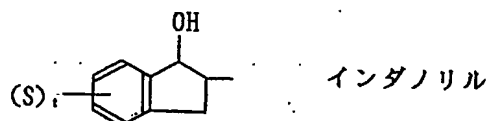
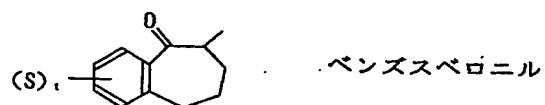
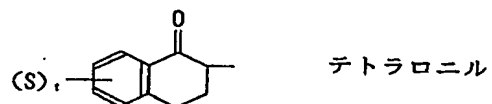
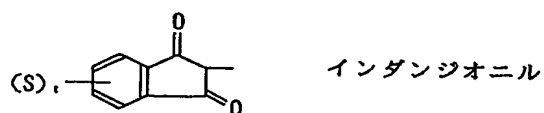
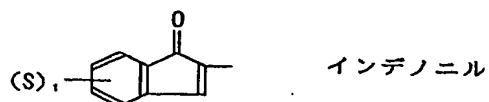
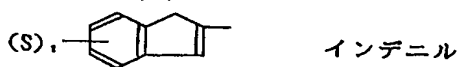
これらのうち、フェニル基に好ましい置換基としては、低級アルキル基、低級アルコキシ基、ニトロ基、ハロゲン化低級アルキル基、低級アルコキシカルボニル基、ホルミル基、水酸基、低級アルコキシ低級アルキル基、ハロゲン、ベンゾ
5 イル基、ベンジルスルホニル基などを挙げることができ、置換基は同一又は相異なって2つ以上でもよい。

ピリジル基に好ましい基としては、低級アルキル基、アミノ基、ハロゲン原子などを挙げることができる。

ピラジル基に好ましい基としては、低級アルコキシカルボニル基、カルボキシ
10 ル基、アシルアミノ基、カルバモイル基、シクロアルキルオキシカルボニル基などを挙げることができる。

また、Jとしてのピリジル基は、2-ピリジル基、3-ピリジル基又は4-ピリジル基が望ましく、ピラジル基は2-ピラジル基が望ましく、キノリル基は2-キノリル基又は3-キノリル基が望ましく、キノキサリル基は2-キノキサリ
15 ル基又は3-キノキサリル基が望ましく、フリル基は2-フリル基が望ましい。

Jの定義において、(b) グループに記載されている①～⑨について、その代表例を示せば以下のとおりである。



上記一連の式において、 t は0又は1～4の整数を意味し、 S は同一又は相異なる前記したJ(a)の定義における置換基のうち1つ又は水素原子を意味するが、

好ましくは水素原子（無置換）、低級アルキル基又は低級アルコキシ基をあげることができる。更に、フェニル環の隣りあう炭素間でメチレンジオキシ基、エチレンジオキシ基などのアルキレンジオキシ基で置換されていてもよい。

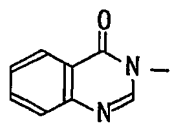
これらのうち最も好ましい場合は、無置換若しくはメトキシ基が1～3個置換
5 されている場合である。

なお、上記のインダノリデニルはJ(b)の定義におけるフェニル基が置換されていてもよい二価の基の例である。すなわちJ(b)の②のインダノニルから誘導される代表的な二価の基である。

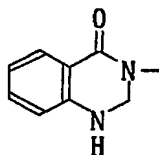
Jの定義において、環状アミド化合物から誘導される一価の基とは、例えばキ
10 ナゾロン、テトラヒドロイソキノリンーオン、テトラヒドロベンゾジアゼピンーオン、ヘキサヒドロベンツアゾシンーオンなどを挙げるができるが、構造式中に環状アミドが存在すればよく、これらのみに限定されない。

単環もしくは縮合ヘテロ環から誘導される環状アミドがありうるが、縮合ヘテ
ロ環としては、フェニル環との縮合ヘテロ環が好ましい。この場合、フェニル環
15 は炭素数1～6の低級アルキル基、好ましくはメチル基、炭素数1～6の低級アルコキシ基、好ましくはメトキシ基あるいはハロゲン原子によって置換されていてもよい。

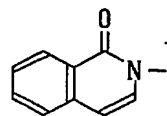
好ましい例を挙げれば次の通りである。



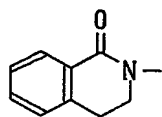
(a)



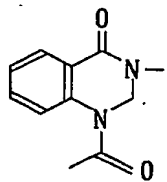
(b)



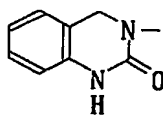
(c)



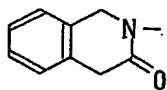
(d)



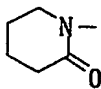
(e)



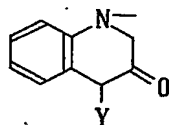
(f)



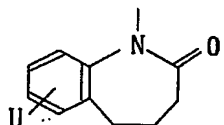
(g)



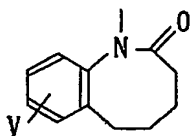
(h)



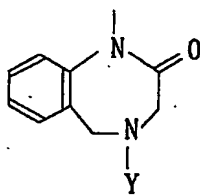
(i)



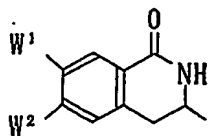
(j)



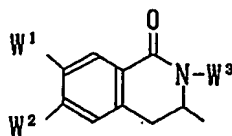
(k)



(l)



(m)



(n)

上記の式中で、式(i),(l)における Y は水素原子又は低級アルキル基を意味し、式(k)における V は水素原子又は低級アルコキシ基、式(m),(n)における W^1, W^2 は水素原子、低級アルキル基、低級アルコキシ基、 W^3 は水素原子又は低級アルキル基を意味する。

- 5 なお、式(j),(l)において、右側の環は7員環であり、式(k)において右側の環は8員環である。

J の上記の定義のうち最も好ましいものは、フェニル環が置換されてもよいインダノンから誘導される一価の基、環状アミド化合物から誘導される一価の基である。

B の定義において、式 $-(\text{CH})_n-$ で示される基は、

$$\begin{array}{c} | \\ \text{R}^2 \end{array}$$

10

R^2 が水素原子である場合は式 $-(\text{CH}_2)_n-$ で表され、更にアルキレン鎖のいずれかの炭素原子に1つ又はそれ以上のメチル基が結合していてもよいことを意味する。この場合、好ましくは n は1～3である。

- 15 また、B の一連の基において、基内にアミド基を有する場合も好ましい基の一つである。

更に好ましい基としては、式 $=(\text{CH}-\text{CH}=\text{CH})_b-$ (式中、 b は1～3の整数を意味する) で示される基、式 $=\text{CH}-(\text{CH}_2)_c-$ (式中、 c は0又は1～9の整数を意味する) で示される基、式 $=(\text{CH}-\text{CH})_d=$ (式中、 d は0又は1～5の整数を意味する) で示される基、式 $-\text{NH}-$ で示される基、式 $-\text{O}-$ で示される基又は式 $-\text{S}-$ で示される基をあげることができる。

20

環 $\begin{array}{c} \text{---T---} \\ | \\ \text{---(CH}_2\text{)}_q\text{---} \\ | \\ \text{---Q---} \end{array}$ については、5～7員環をとりうる。具体的

には $\text{---}\text{C}_6\text{H}_{11}\text{N---}$ 、 $\text{---N---C}_6\text{H}_{11}\text{---}$ 、 $\text{---N---C}_5\text{H}_9\text{---}$ 、 $\text{---N---C}_4\text{H}_8\text{---}$ 、 $\text{---C}_4\text{H}_7\text{N---}$

などをあげることができるが、特に好ましい環は式 $\text{---}\text{C}_6\text{H}_{11}\text{N---}$ (T=C 、

Q=N)で表されるピペリジンの場合である。

K の定義における「置換又は無置換のフェニル基」、「置換もしくは無置換のアリールアルキル基」において、置換基は前記の J の定義において(a)の①～⑦において定義されたものと同一のものである。

- 5 アリールアルキル基とは、フェニル環が上記の置換基で置換されるか、無置換のベンジル基、フェネチル基などを意味する。

ピリジルメチル基とは具体的には、2-ピリジルメチル基、3-ピリジルメチル基、4-ピリジルメチル基などを挙げることができる。

- 10 K については、フェニル基が置換されてもよいアリールアルキル基、置換若しくは無置換のフェニル基、フェニル基が置換されてもよいシンナミル基が最も好ましい。

好ましいアリールアルキル基は、具体的には例えばベンジル基、フェネチル基などをいい、これらはフェニル基が炭素数1～6の低級アルコキシ基、炭素数1～6の低級アルキル基、水酸基などで置換されていてもよい。

- 15 $\text{---}\text{---}$ は単結合もしくは二重結合を意味する。

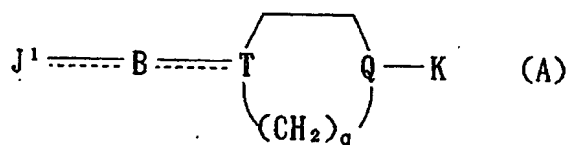
二重結合である場合の例をあげれば、上記で述べたフェニル環が置換されてもよいインダノンから誘導される二価の基の場合、すなわちインダノリデニル基である場合をあげることができる。

本発明において、薬理学的に許容できる塩とは、例えば塩酸塩、硫酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩などの無機酸塩、蟻酸塩、酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、マレイン酸塩、酒石酸塩、メタンスルホン酸塩、ペンゼンスルホン酸塩、トルエンスルホン酸塩などの有機酸塩を挙げることができる。

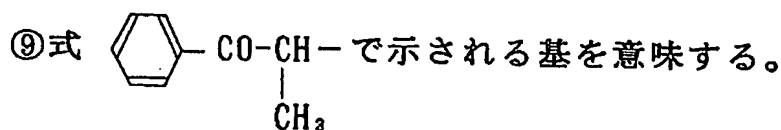
- 5 また置換基の選択によっては、例えばナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩、カルシウム塩、マグネシウム塩のようなアルカリ土類金属塩、トリメチルアミン塩、トリエチルアミン塩、ピリジン塩、ピコリン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、N,N'-ジベンジルエチレンジアミン塩などの有機アミン塩、アンモニウム塩などを形成する場合もある。
- 10 なお、本発明において上記化合物は、置換基の種類によっては不斉炭素を有し、光学異性体が存在しうるが、これらは本発明の範囲に属することはいうまでもない。

具体的な例を一つ述べれば、Jがインダノン骨格を有する場合、不斉炭素を有するので幾何異性体、光学異性体、ジアステレオマーなどが存在しうるが、何れも本発明の範囲に含まれる。

これらの定義を総合して特に好ましい化合物群をあげれば次のとおりである。



- [式中、J¹はフェニル基が置換されていてもよい次の群から選択された一価又は二価の基；①インダニル、②インダノニル、③インデニル、④インデノニル、⑤インダンジオニル、⑥テトラロニル、⑦ベンズスペロニル、⑧インダノリル、

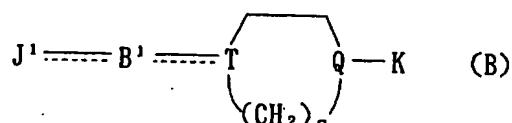


B,T,Q,q,K は前記と同様の意味を有する。]

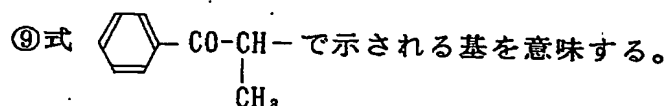
で表される環状アミン又は薬理学的に許容できる塩。

上記の J^1 の定義中、最も好ましい基としては、フェニル基が置換されていてもよいインダノニル基、インダンジオニル基、インダノリデニル基をあげることができる。また、この場合、フェニル基は置換されていないか、同一又は相異なる水酸基、ハロゲン、低級アルコキシ基で置換されている場合が最も好ましい。低級アルコキシ基とは、炭素数 1～6 の例えばメトキシ基、エトキシ基、イソプロポキシ基、 n -プロポキシ基、 n -ブトキシ基などをいい、1～4 置換をとりうるが、2 置換の場合が好ましい。最も好ましい場合はメトキシ基が 2 置換となっている場合である。

(A) 式に含まれる化合物の中で更に好ましい化合物群としては、次の一般式で表される化合物(B) をあげることができる。



〔式中、 J^1 はフェニル基が置換されていてもよい次の群から選択された一価又は二価の基；①インダニル、②インダノニル、③インデニル、④インデノニル、⑤インダンジオニル、⑥テトラロニル、⑦ベンズスベロニル、⑧インダノリル、



15

B^1 は式 $\text{---}(\text{CH})_n\text{---}$ (式中、 n は 0 又は 1～10 の整数を意味

する。 R^2 は式 $\text{---}(\text{CH})_n\text{---}$

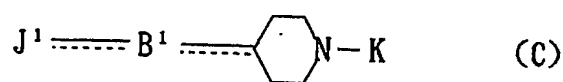
で示されるアルキレン基が置換基を持たないか、又は 1 つ又は 1 つ以上のメチル基を有しているような形で水素原子又はメチル基を意味する。) で示される基、

20 式 $\text{---}(\text{CH}\cdot\text{CH}=\text{CH})_b\text{---}$ (式中、 b は 1～3 の整数を意味する) で示される基、式

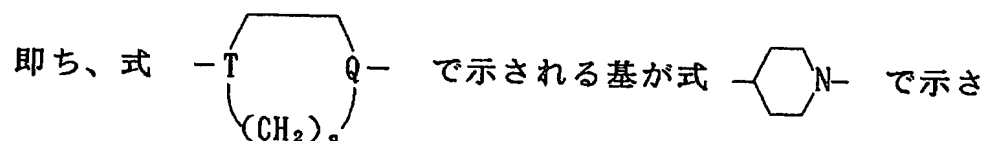
=CH-(CH₂)_c- (式中、c は 0 又は 1 ～ 9 の整数を意味する) で示される基又は式=(CH-CH)_d= (式中、d は 0 又は 1 ～ 5 の整数を意味する) で示される基を意味する。

T, Q, q, K は前記と同様の意味を有する。]

- 5 (B) 式に含まれる化合物の中で更に好ましい化合物群としては、次の一般式で表される化合物(C) をあげることができる。

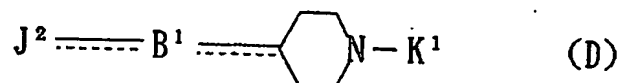


(式中、 J^1, B^1, K は前記と同様の意味を有する。)



れる基、即ちピペリジンの場合である。

- (C) 式に含まれる化合物の中で更に好ましい化合物群としては、次の一般式で表される化合物(D) をあげることができる。



- 15 (式中、J² はフェニル基が置換されてもよいインダノニル、インダンジオニル、インダノリデニル基から選択された基を意味する。

K¹は置換若しくは無置換のフェニル基、置換されてもよいアリールアルキル基、置換されてもよいシンナミル基を意味する。

B¹は前記と同様の意味を有する。)

3. 神経細胞保護

本発明において、中枢神経系の神経細胞とは、脳由来の成熟した神経細胞（好ましくは、神経回成に取り込まれ機能的に成熟したヒト又はヒト以外の哺乳動物由来の中枢神経系の神経細胞）を意味し、大脳皮質、中隔野及び海馬からなる群から選択されるいずれかに由来する細胞である。

本発明において、中枢神経系の神経細胞保護とは、中枢神経系の神経細胞に対する脳虚血等の虚血様作用によるもの、NMDA(N-methyl-D-aspartate)、カイン酸など興奮性物質による興奮性毒性によるもの、ペプチド又はタンパク質の凝集体毒性（A β 毒性、プリオン毒性を含む）によるもの、NO(nitric oxide)や活性酸素種によるものの他、様々の負荷に対する保護作用をいう。また、脳虚血により誘発される神経細胞傷害には、例えば脳卒中、脳梗塞、脳塞栓（最近ではアルツハイマーの原因とも言われている）などの、脳神経の変性疾患等の傷害を含む。

当該ペプチド又はタンパク質の凝集体毒性、特に A β 毒性は、アルツハイマー病又はダウン症に伴って誘発されるものも含まれる。

当該神経細胞保護は、例えば、中枢神経系の神経細胞に対する負荷（例えば、ストレス、栄養障害、病気、外傷、手術などによる体力低下、衰弱、老化など、恒常性維持に好ましくない物理的または化学的な障害もしくは細胞毒性作用）による神経細胞死を実際に防止する作用のほか、神経細胞の機能低下を防止する作用を含む広い意味に用いる。

神経細胞が保護されたか否かを調べるためには、神経細胞を調製する必要がある。この場合、細胞は特に限定されるものではなく、生体試料から調製した初代培養細胞であってもよい。生体試料からの初代培養細胞の調製方法は、例えば、大脳皮質由来の初代培養神経細胞は大脳皮質より得ることができ、中隔野細胞由来の初代培養神経細胞は、中隔部位、つまり中隔野及び前脳基底核を含む部位から得ることができる。

細胞の採取源となる動物種は、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウ

サギ等のいずれでもよく、特に限定されるものではない。細胞は、胎仔から成体までのいずれの成長過程からも採取することもできるが、胎仔（例えば胎生 18 日齢）から調製することが好ましい。採取した組織を、トリプシン処理又はコラゲナーゼ等で処理することにより、神経細胞を得ることができる。

- 5 細胞培養は、通常の動物細胞の培養方法で行うことができ、当業者であれば、適当な培養条件を設定することができる。

4. 神経細胞保護剤、保護方法

- 前述の化合物 Q は、神経細胞（中でも中枢神経系の神経細胞）の障害に対して
10 保護作用を有する。また、アセチルコリンエステラーゼ遺伝子（AChE 遺伝子）の siRNA は、AChE 遺伝子の発現を抑制して AChE の機能を阻害し、 $A\beta$ の産生を抑制する。したがって、本発明において化合物 Q 又は後述の AChE 遺伝子の siRNA は、上記脳卒中、脳梗塞、脳塞栓などの脳神経の変性疾患中枢神経保護剤、神経細胞障害の予防剤、治療剤及び／又は予後改善剤（以下、「本発明の
15 保護剤等」ともいう）の有効成分として有用であり、アルツハイマー病及びダウン症等の治療剤、治療方法、予後改善剤及び予後改善方法が提供される。

- 本発明の保護剤等の有効成分（例えば、塩酸ドネペジル）は、無水物であってもよく、水和物を形成していてもよい。また、例えば、上記ドネペジルには結晶多型が存在することもあるがこれに限定されず、いずれかの結晶形が単一であつてもよいし、結晶形混合物であってもよい。
20

- 本発明において用いる化合物 Q（例えば塩酸ドネペジル）は、公知の方法で製造することができる。代表的な例として、特開平 1-79151 号公報、特許 2578475 号公報、特許 2733203 号公報、あるいは特許 3078244 号公報に開示されている方法により容易に製造することができる。また、塩酸ドネペジルは、細粒剤等の
25 製剤としても入手できる。

本発明において用いる siRNA は、後述の方法に従って設計し、当業者であれば核酸合成装置等を用いた公知の方法で製造することができる。

本発明の保護剤等には、化合物 Q または AChE 遺伝子の siRNA をそのまま用

いることも、公知の薬学的に許容できる担体等を配合して製剤化することも可能である。このような薬学的に許容できる担体としては、例えば、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、着色剤、矯味矯臭剤、安定化剤、乳化剤、吸収促進剤、界面活性剤、pH調整剤、防腐剤、抗酸化剤等を挙げることができる。製剤化の剤形として、
5 経口的投与形態に用いられる錠剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、カプセル剤、シロップ剤等が、また非経口的投与形態に用いられる坐剤、注射剤、軟膏剤、パップ剤等が挙げられる。

また、本発明の保護剤等の投与形態は特に限定されず、経口又は非経口的に投与することができる。例えば、経口投与形態として、塩酸ドネペジルの細粒剤は
10 商品名アリセプト細粒（エーザイ株式会社）、錠剤は商品名アリセプト錠（エーザイ株式会社）として入手することができる。あるいは、非経口投与の形態として、経皮吸収、静脈内注射、皮下注射、皮内注射、筋肉内注射又は腹腔内注射などが挙げられるが、好ましくは静脈内注射である。また、注射剤は、非水性の希釈剤（例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール等のグリコール、
15 オリーブ油等の植物油、エタノール等のアルコール類など）、懸濁剤又は乳濁剤として調製することが可能である。注射剤の無菌化は、フィルターによる濾過滅菌、殺菌剤の配合等により行えばよい。また、注射剤は、用時調製の形態として製造することができる。即ち、凍結乾燥法などによって無菌の固体組成物とし、使用前に無菌の注射用蒸留水または他の溶媒に溶解して使用することができる。
20 貼布剤として経皮吸収により投与する場合には、塩を形成しない、いわゆるフリー体を選択することが好ましい。

経口投与における化合物 Q の投与量は、塩酸ドネペジルを例にあげると、好ましくは、0.1～100 mg/日であり、さらに好ましくは1.0～50 mg/日であり、また、AChE 遺伝子の siRNA の好ましい投与量としては、0.01～
25 100 mg/日であり、さらに好ましくは0.1～50 mg/日である。

非経口投与において、貼布剤の場合、好ましい投与量としては、5～50 mg/日であり、さらに好ましくは10～20 mg/日である。また、注射剤の場合には、生理食塩水又は市販の注射用蒸留水等の薬学的に許容される担体中に0.1

$\mu\text{g/ml}$ 担体 $\sim 10\text{mg/ml}$ 担体の濃度となるように溶解または懸濁することにより製造することができる。このようにして製造された注射剤の投与量は、処置を必要とする患者に対し、 $0.01\sim 5.0\text{mg/日}$ であり、さらに好ましくは $0.1\sim 1.0\text{mg/日}$ であり、一日あたり1 ~ 3 回に分けて投与することができる。

5

5. 機能評価方法

本発明の神経細胞保護剤が、虚血性の傷害から神経細胞を保護する効果については、OGD (Oxygen Glucose Deprivation :酸素グルコース除去) 試験によって評価することが可能である。また、本発明の神経細胞保護剤が、興奮性毒性から

10 神経細胞を保護する効果については、NMDA またはカイニン酸刺激試験によって評価することが可能である。さらに、本発明の神経細胞保護剤が、 $A\beta$ 毒性から神経細胞を保護する効果については、 $A\beta$ 毒性試験または $A\beta$ 凝集試験によって評価することが可能である。以下、それぞれの試験方法について説明する。

(1) OGD 試験

15 OGD 試験では、ラット初代培養大脳皮質神経細胞に対して酸素・グルコース除去による負荷を与えることによって虚血様細胞傷害を誘発するというモデルを用いる。そして、当該モデルにおいて、塩酸ドネペジルが前記虚血様傷害に対して神経細胞保護作用を有するかどうかの検討を行う。

本実施例においては、初代培養神経細胞はラット胎仔 (胎生 17-19 日齢) の大

20 脳皮質より得ることができる。細胞は通常の動物細胞の培養環境下、例えば、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 環境下で、7 日以上培養したものをを用いることができる。OGD 処理は、培養したラット初代培養大脳皮質神経細胞をグルコースの入っていない緩衝液中に置き、続いて密閉されたチャンパーに移し、窒素置換を行い低酸素環境にすることによって行う。OGD 処理後の細胞は、グルコースの入っていない緩衝液から

25 細胞培養用溶液に置換し、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 環境下で一晩培養する。

(A) 化合物 Q、例えばドネペジルにより虚血性の傷害から神経細胞を保護の効果が認められるか否かを明らかにするには、まず、OGD 処理の前後で当該化合物を添加した条件で本実施例を行えばよい。例えば、OGD 処理の 12 時間前か

らドネペジルを添加した Pre-12h、OGD 処理の 1 時間前からドネペジルを添加した Pre-1h 及び OGD 処理の 1 時間後からドネペジルを添加した Post-1h と、OGD 処理をしなかった Cont 及び OGD 処理前後にドネペジルを加えなかった Vehicle との神経細胞保護作用を比較する。神経保護作用の指標としては、LDH の放出の抑制率を用いることができる。LDH (lactate dehydrogenase) は細胞質に存在する酸化還元酵素であり、ピルビン酸を乳酸へと変換し、それに伴って細胞内の NADH (nicotinamide adenine dinucleotide) 量を減少させる。したがって、細胞が OGD により傷害を受けると LDH が細胞内から細胞外の溶液中に流出し、その溶液には細胞の傷害度 (細胞死) に応じて LDH が存在することになる。また、溶液中に存在する LDH の量はその溶液にピルビン酸、および、NADH を加え、NADH の減少率を吸光度計により測定することによって分かる。本試験例により、OGD 処理の 1 2 時間前からドネペジルを添加した場合 (Pre-12h) に、もっとも神経保護効果を奏することが示される。

(B) また、前述のように OGD 処理したラット初代培養神経細胞を顕微鏡により形態を観察することにより、細胞の受けた傷害の程度、または化合物による神経細胞の保護の程度を観察することもできる。Vehicle 処置細胞は、コントロール細胞と比較して、正常な形態をとらない。一方、OGD 処理前にドネペジルを処置した場合には、Vehicle 処置細胞ほどの細胞の傷害はみられず、OGD 処理前の神経細胞に近い形態を示す。従って、細胞形態の側面からも、OGD 処理前にドネペジルを添加することにより、神経細胞が保護されているということが示される。

(C) さらに、前述の試験と同様の操作により、ラット初代培養神経細胞を OGD 処理し、その際に各種アセチルコリンエステラーゼ阻害剤 (ガランタミン、タクリン、リバスチグミン) 及びドネペジルを用いてそれぞれの濃度を変えて細胞に添加した際の LDH 放出に及ぼす影響について試験を行うこともできる。この試験において、ドネペジルのアセチルコリンエステラーゼ 50 % 阻害濃度はリバスチグミンとほぼ同等であるが、リバスチグミンや他のアセチルコリンエステラーゼ阻害剤は神経細胞保護作用を示さなかった。従って、ドネペジルによる OGD

処置神経に対する神経保護作用がアセチルコリンエステラーゼ阻害作用とは異なる作用機序に基づくものであることを示唆している。

(D) 次に、前述のドネペジルの神経細胞保護作用が、アセチルコリン受容体を介するものであるのかを調べるために、アセチルコリン受容体アンタゴニストであるスコポラミン（ムスカリン受容体アンタゴニスト）及びメカミラミン（ニコチン受容体アンタゴニスト）を細胞に添加した際にドネペジルによる保護作用がどのように影響を受けるのかを調べる。本試験により、ドネペジルの神経細胞保護作用は、スコポラミン及びメカミラミンの添加により影響は受けず、従って、ドネペジルの神経細胞保護作用は、アセチルコリン受容体を介するものではないことを示している。

(2) 興奮性毒性試験

(A) NMDA 毒性

興奮性毒性試験では、初代培養神経細胞における NMDA (N-methyl-D-aspartate) 毒性に対する化合物（例えばドネペジル）の細胞保護作用を検討する。ラット初代培養大脳皮質神経細胞に対して NMDA 刺激を与えることによって細胞傷害を誘発するモデルを用いる。方法は、前述のようにして得られたラット初代培養神経細胞に対して、NMDA を添加（例えば 100 μ M を 9 時間添加）し、その後、培養液中に存在する LDH の量を測定すればよい。ドネペジルは NMDA 刺激を加える前、例えば 1 2 時間前から細胞に添加しする。そして、NMDA 添加後、例えば 9 時間後に培養液中に存在する LDH の量を測定し、神経保護作用の指標とすることができる。

本試験によりドネペジルは NMDA 興奮性毒性に対して濃度依存的に神経細胞保護効果を示すことが明らかである。

(B) カイニン酸毒性

カイニン酸は、アルツハイマー病の原因因子の一つとされている β -アミロイドが誘発する神経細胞死を増強するといわれている。本試験では、ラット初代培養大脳皮質神経細胞において、カイニン酸により誘発される細胞傷害に対して、

化合物（例えば、ドネペジル）による細胞保護作用を検討する。

カイニン酸処置は、例えば、7日以上培養した細胞の培地にカイニン酸を加え、37℃、5%CO₂環境下で一晩培養すればよい。化合物Q（例えばドネペジル）は、カイニン酸刺激を加える前、例えば24時間前から細胞に添加する。そしてカイニン酸添加後、例えば24時間後に培養液中に存在するLDHの量を測定し、神経保護作用の指標することができる。本試験において、ドネペジルは、用量依存的に神経細胞のLDH放出を抑制することから、ドネペジルはカイニン酸興奮性毒性に対して濃度依存的に保護効果を示すことが明らかである。

10 (3) Aβ毒性試験またはAβ凝集試験

(A) 培養中隔野神経細胞

Aβはアルツハイマー病の原因と考えられており、また、アルツハイマー病では、記憶や学習に関与する中枢のコリン作動性神経が脱落する。そして、コリン作動性神経は、中隔野から海馬などのアルツハイマー病で障害を受けやすい領域に投射されている。以上の知見と、塩酸ドネペジルの投与によってアルツハイマー病による海馬の体積減少が抑制されることを考慮すると、コリン作動性神経において、化合物（例えば、ドネペジル）のAβ毒性に対する保護効果及びAβ凝集抑制効果を解析することが好ましい。

中隔野神経細胞の多くは、アセチルコリン合成酵素であるコリンアセチルトランスフェラーゼ（ChAT）を有するために、コリン作動性神経であると考えられる。本発明では、コリン作動性神経である前記中隔野神経細胞において、ドネペジルによるAβ凝集抑制作用によるコリン作動性神経細胞の毒性に対する細胞保護効果を初めて示したものである。

中隔野神経細胞は、生体から採取し、培養することで得ることができ、その由来はマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ等のいずれでもよく、種に限定されない。細胞は、胎仔から成体までのいずれの成長過程からも採取することもできるが、胎仔（例えば胎生18日齢）から調製することが好ましい。脳の中隔部位、つまり、中隔野及び前脳基底核を含む部位を切り出し、トリプシン

処理を行うことで細胞を得ることができる。

中隔野神経細胞は、前記のように得られた細胞を、培養プレートに適当な濃度で播種しての培養することができる。培養プレートは、ポリ D-リジンでコートしたプレートであることが好ましく、濃度は、例えば 96 ウェルポリ D-リジンコートプレートにウェルあたり 1.2×10^5 細胞で播種することが好ましい。培地は、5% fetal calf serum を含む DMEM を用いることができ、DMEM は、 $5 \mu\text{g/ml}$ insulin、 30 nmol/L sodium selenite、 $100 \mu\text{mol/L}$ putrecine、 20 nmol/L progesterone、 15 nmol/L biotin、 100 units/ml penicillin、 $100 \mu\text{g/ml}$ streptomycin、 1 mmol/L sodium pyruvate 等を含むことがより好ましい。

- 10 培養中隔野神経細胞がコリン作動性神経であることの確認は、上記のように ChAT の発現を指標に用いて行うことができる。ChAT の発現の有無は、培養中隔野神経細胞を抗 ChAT 抗体で免疫染色して確認することができる。

(B) A β 凝集の検出

- 15 本発明において、A β の凝集は A β の β -シート構造形成に起因する 215~260nm における CD(circular dichroism)スペクトルの変化を指標に用いて検討することができる。215~260nm における CD(circular dichroism)スペクトルは、A β が α -ヘリックス構造又は β -シート構造を形成すると減少する。特に、 β -シート構造の形成は、215 nm 周辺の CD スペクトルを減少させることが知られている。

- 20 また別の態様として、培養液中での A β の凝集を簡便に検討するため Thioflavin T を用いて A β の蛍光を測定することができる。細胞に A β (1-42) を添加 48 時間後、培地を採って $10 \mu\text{mol/L}$ の Thioflavin-T を添加し、直後に excitation 波長 450 nm, emission 波長 490 nm で蛍光測定する (Wall J., Schell M., Murphy C., Hrnacik R., Stevens F.J., Solomon A. (1999) Thermodynamic instability of human lambda 6 light chains: correlation with fibrillogenicity. *Biochemistry*. 38(42), 14101-14108.)。
- 25

(C) A β 毒性の検出

A β は β -シート構造をとると A β 繊維の固まりを形成しやすくなり、毒性を

示すことが知られている。本発明において $A\beta$ 毒性の検出は、中隔野神経細胞に $A\beta$ を添加した後に、細胞障害を測定する公知の方法を用いて行なうことができ、次に好適な代表例を記載するがこれに限定されない。例えば、上記 (1) と同様に培地中の LDH 量を指標に用いて検討する。あるいは、本発明において、 $A\beta$ 毒性は、中隔野神経細胞に $A\beta$ を添加した後に、MTT (dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide) アッセイによって検討する。MTT アッセイの方法は、例えば、MTT (シグマ社製) を培地中に終濃度が 1mg/ml になるように加え、37℃で1時間インキュベーション後、培地を取り除き、細胞を DMSO で可溶化し、その吸光度(550nm)を測定すればよい。あるいは、alar blue による細胞障害測定方法によって検討する。alar blue による該方法は、培地の 10 分の 1 量の alar blue(和光純薬社製)を加え、5%CO₂ 環境下で反応させる。4 時間後、励起波長 530nm, 蛍光波長 590nm, gain 35 で測定する。培地のみを 0%, コントロールを 100%として換算する。

細胞に添加する $A\beta$ は、全長の $A\beta$ を用いてもよいし、N 末端から 40 残基のみの $A\beta$ (1-40)を用いてもよいし、 β シート構造をとる配列である限り、いずれの長さの $A\beta$ を用いてもよい。

また、 $A\beta$ 毒性による細胞死の程度は抗 MAP2 抗体による免疫染色によっても検討することができる。前記の MAP2 は神経細胞のマーカーであるため、MAP2 を発現する細胞の量から、 $A\beta$ 毒性による神経細胞の脱落の程度を確認することができる。あるいは、トリパンブルーによる細胞障害測定方法によって検討する。トリパンブルー (和光純薬社製) を加え、濃青で染色されない細胞を生細胞として数を数える。

(D) 中隔野神経細胞の $A\beta$ 毒性に対する神経保護剤及び $A\beta$ 凝集抑制剤

アセチルコリンエステラーゼ(AChE)遺伝子の siRNA を、中隔野神経細胞に添加すると、細胞内の AChE 活性が低下する。siRNA の処置により $A\beta$ 毒性に対する中隔野神経細胞の障害が緩和されることが、上記 (C) の LDH を測定することにより示される。

また、当該 siRNA を添加した中隔野神経細胞において、siRNA の処置により

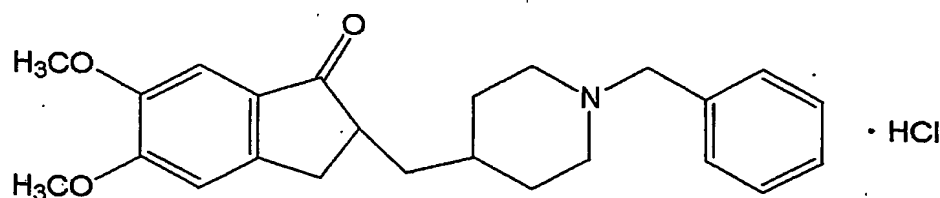
A β 凝集作用が抑制されることが、上記(B)のCDスペクトルを測定することにより示される。

5 以上のことから、中隔野神経細胞のA β 毒性及びA β 凝集には、AChEが関与していることを明らかである。従って、アセチルコリンエステラーゼの機能阻害作用を有する化合物であって、実質的にアセチルコリンエステラーゼとA β との相互作用を抑制する作用を併せ持つ化合物を含有するA β 凝集抑制剤は、本発明に含まれる。

「相互作用」とは、アセチルコリンエステラーゼとA β が結合することを意味する。「実質的にアセチルコリンエステラーゼとA β との相互作用を抑制する」
10 とは、アセチルコリンエステラーゼ存在下にA β の凝集が促進されることを抑制することであることを意味する。そして、A β 毒性が阻害される限り、「実質的」に相互作用が抑制されるといえる。

アセチルコリンの機能低下作用は、アセチルコリンエステラーゼの活性阻害によるものであっても、アセチルコリンエステラーゼ遺伝子の発現阻害によるもの
15 であってもよい。

AChEの活性阻害は、アセチルコリンとA β との相互作用を抑制する限り、AChEの酵素活性を阻害するものであれば、いずれの化合物であってもよく（例えば下記式の塩酸ドネベジル）、また、抗AChE抗体であってもよい。



20 AChE遺伝子の発現阻害は、アセチルコリンとA β との相互作用を抑制し、かつ、AChE遺伝子の発現を阻害するものであれば、RNAiを生ずるいずれの核酸（siRNAやshRNA）であってもよい。RNAiによりAChE遺伝子の発現を抑制するには、例えばAChE遺伝子に対するsiRNA(small interfering RNA)または、
25 shRNA(short hairpin RNA)を設計及び合成し、これを作用させてRNAiを起こ

させればよい。siRNA は、細胞内で Dicer によってプロセッシングを受けて産生される短鎖 RNA である。一方、shRNA はヘアピン構造に折り畳まれた小さな RNA 分子であり、センス鎖とアンチセンス鎖をループでつないだステムループ構造を持つ。

5 siRNA の設計基準は以下の通りである。

(a) AChE をコードする遺伝子の開始コドンの下流の領域を選択する。開始コドンより下流の配列であれば特に限定されるものではなく、任意の領域を全て候補にすることが可能である。

10 (b) 選択した領域から、aa で始まる連続する 11 ～ 30 塩基、好ましくは 21 ～ 25 の配列を選択する。

具体的には、以下の塩基配列を標的配列とし、この標的配列を含み、かつ、30 塩基以下、例えば 11 ～ 30 塩基の長さ（好ましくは 21 ～ 25 塩基の長さ）の配列を siRNA として使用することができる ((i-1) と (i-2)、及び (ii-1) と (ii-2))。

(i-1) 5'-AAUGUCAGUGACUCUGUUUTT-3' (配列番号 1)

15 (i-2) 5'-AAACAGAGUCACUGACAUTTT-3' (配列番号 2)

(ii-1) 5'-GCUGCCUCAAGAAAGUAUUCTT-3' (配列番号 3)

(ii-2) 5'-GAUACUUUCUUGAGGCAGCTT-3' (配列番号 4)

本発明において AChE 遺伝子の siRNA は、(i-1) と (i-2) との組み合わせ、及び (ii-1) と (ii-2) との組み合わせで形成する二本鎖 RNA の形で用いることが好ましい。

20 また、shRNA の設計基準は以下の通りである。

(a) RNAi に使用する AChE に対する shRNA 配列は、遺伝子に特異的な 5'末端領域から 300 塩基までの間で設計する (Elbashir, S.M. et. al. Genes Dev. 15, 188-200 (2001))。

25 (b) それぞれの遺伝子転写産物の 5'末端に近い領域から、aa 又は a から始まる mRNA 配列を標的配列として選択及び設計する。標的領域の長さは特に限定されるものではなく、好ましくは 30 bp 以下、より好ましくは 21 ～ 25 bp 程度である。

siRNA 及び shRNA を培養中隔野神経細胞に導入するには、in vitro で合成し

た siRNA 及び shRNA をプラスミド DNA に連結してこれを細胞に導入する方法、2 本の RNA をアニールする方法などを採用することができる。

また、A β 凝集抑制効果を示す siRNA 又は shRNA の構造解析から予想される化合物であって、A β 凝集抑制効果を有するものも本発明に含まれる。

- 5 (E) コリンエステラーゼ阻害剤又はコリンエステラーゼ遺伝子の siRNA による A β 凝集抑制作用及び A β 毒性に対する保護作用の検出

本発明は、A β 凝集抑制作用を有する化合物またはその薬理学的に許容される塩のスクリーニング方法を提供する。つまり、中枢神経系の神経細胞に、A β の存在下に被検化合物（候補化合物）を添加したときの 215~260nm、特に 215 nm
10 における CD スペクトルの減少を測定することで、A β の凝集を抑制する化合物のスクリーニングを行うことができる。被検化合物が A β 凝集抑制作用を有するかの判断は、被検化合物による A β 凝集量を、候補化合物の非存在下における A β 凝集量と比較することで行うことができる。本発明は、上記方法に使用するための A β 凝集抑制作用を有する化合物又はその薬学的に許容される塩のスクリー
15 ニングキットも提供する。

本発明のキットには、A β 凝集抑制を上記(B)の CD スペクトル法で測定するために必要なものが含まれる。A β 凝集に必要な A β 、CD スペクトル測定時に使用される試薬類は、下記の実施例 6 及び 7 において使用したものが好適に用いられる。

- 20 また、本発明は、A β 毒性によって誘発される中枢神経系の神経細胞障害の予防及び／又は治療に有効な化合物またはその薬理学的に許容される塩のスクリーニング方法を提供する。つまり、被検化合物及び A β を培養中隔野神経細胞に添加したときの細胞傷害又は細胞死を検出することによって、A β 毒性によって誘発される中枢神経系の神経細胞障害の予防及び／又は治療に有効な化合物のスク
25 リーニングを行うことができる。上記の細胞障害又は細胞死は、上記(C)に記載の LDH 量を測定することによって、あるいは MTT アッセイ等によって検出することができる。本発明は、上記方法に使用するための A β 毒性によって誘発される中枢神経系の神経細胞障害の予防及び／又は治療に有効な化合物又はその薬学的

に許容される塩のスクリーニングキットも提供する。

また、本発明のキットには、 $A\beta$ 毒性による神経細胞障害を上記(C)の細胞外 LDH 量を指標に測定するために必要なもの、あるいは、MTT アッセイ等を実施するために必要なものが含まれる。 $A\beta$ 毒性による細胞障害の程度を LDH で測定
5 するために必要な試薬類は、下記の実施例 1, 2, 3, 5 及び 7 において使用したものが好適に用いられるが、例えば、NADH、ピルビン酸が挙げられる。また、 $A\beta$ 毒性による細胞障害の程度を MTT で測定するために必要な試薬類は、例えば MTT が挙げられる。

これらのキットを構成する各成分は、別個に用意してもよく、あるいは、支障
10 がない限り共存させていてもよい。キットは溶液を含んでもよく、あるいはそのような溶液を配合するための成分が濃縮形態であってもよい。

さらに必要に応じて、本キットは補助剤、専用容器、その他の必要なアクセサリ、説明書などを含んでもよい。

本発明において、ドネペジルのようなアセチルコリンエステラーゼ阻害剤又は
15 アセチルコリンエステラーゼ遺伝子の siRNA による $A\beta$ 凝集抑制作用は、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤を、 $A\beta$ の添加前（例えば 24 時間）に添加し、 $A\beta$ の添加後（例えば 48 時間後）に、前述の CD スペクトルを測定することによって確認することができる。

また、同様に処置した細胞において、培地中の LDH 量を測定することで、ド
20 ネペジルのようなアセチルコリンエステラーゼ阻害剤又はアセチルコリンエステラーゼ遺伝子の siRNA による $A\beta$ 毒性に対する保護作用を確認することができる。

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本実施例により本発明は限
25 定されるものではない。

実施例 1 : OGD 試験

本実施例では、ラット初代培養大脳皮質神経細胞に対して酸素・グルコース除去による負荷を与えることによって虚血様細胞傷害を誘発するモデルを用いた。

塩酸ドネペジルが前記虚血様傷害に対して神経細胞保護作用を有するかどうかの検討を行った。

本実施例においては、初代培養神経細胞はラット胎仔（胎生 17-19 日齢）の
脳皮質より得た。培養液は DMEM (Gibco BRL) に 10% fetal calf serum (Gibco
5 BRL), 10% horse serum (Gibco BRL), 5 μ g/ml insulin (Sigma), 30 nM sodium
selenite (Sigma), 100 μ M putrecine (Sigma), 20 nM progesterone (Sigma), 15
nM biotin (Sigma), 100 units/ml penicillin (Gibco BRL), 100 μ g/ml
streptomycin (Gibco BRL), 8 mM glucose and 1 mM pyruvic acid (Sigma)を用
い(参照文献 Scholtz et al., 1988)、細胞は 37℃、5% CO₂ 環境下で培養した。7
10 日以上培養した後、OGD 処理を施した。OGD 処理は、ラット初代培養大
脳皮質神経細胞をグルコースのっていない緩衝液：Krebs-Ringer bicarbonate
buffer (5.36 mM KCl, 1.26 mM CaCl₂, 0.44 mM KH₂PO₄, 0.49 mM MgCl₂, 0.41
mM MgSO₄, 137 mM NaCl, 4.17 mM NaHCO₃, 0.34 mM Na₂HPO₄, 10 mM
HEPES (pH 7.4))中に置き、それから密閉されたチャンバーに移し、窒素置換し、
15 低酸素環境にすることによって行った。OGD 処理後の細胞は、グルコースの
っていない緩衝液から細胞培養用溶液に置換し、37℃、5% CO₂ 環境下で一晩培
養した。まず、OGD 処理の前後でドネペジルを添加することによって神経細胞
保護の効果が認められるのか、また、変化するのかを検討した。OGD 処理の 12
時間前からドネペジルを添加した Pre-12h、OGD 処理の 1 時間前からドネペジ
20 ルを添加した Pre-1h 及び OGD 処理の 1 時間後からドネペジルを添加した
Post-1h と、OGD 処理をしなかった Cont 及び OGD 処理前後にドネペジルを加
えなかった Vehicle との神経細胞保護作用を比較した。神経保護作用の指標とし
ては、LDH の放出の抑制率を用いた。LDH (lactate dehydrogenase) は細胞質
に存在する酸化還元酵素であり、ピルビン酸を乳酸へと変換し、それに伴って存
25 在している NADH (nicotinamide adenine dinucleotide) 量を減少させる。した
がって、細胞が OGD により傷害を受けると LDH が細胞内から細胞外の溶液中
に流出し、その溶液には細胞の傷害度（細胞死）に応じて LDH が存在すること
になる。また、溶液中に存在する LDH の量はその溶液にピルビン酸、および、

NADHを加え、NADHの減少率を吸光度計により測定することによって分る。結果を図1に示す。図1から明らかなように Pre-12h が最も大きな LDH 放出抑制作用を示し、以下 Pre-1h、Post-1h と続いた。この結果により、OGD 処理の12時間前からドネペジルを添加した場合に、神経細胞を効果的に保護するということが分かる。これ以降のOGD試験におけるドネペジルの添加時間はいずれも Pre-12h に固定した。

次に、先ほどの試験と同様の操作によりラット初代培養細胞をOGD処理した際の神経細胞を、顕微鏡で観察した。結果を図2に示す。図2から明らかなように、Vehicle (B) ではコントロール (A) と比較して細胞が正常な状態をとどめておらず、OGDによってダメージを受けていることが顕著である。一方、OGD処理の前にドネペジルを添加した場合には、(B)に見られるような神経細胞のダメージは見られず、OGD処理前の神経細胞の状態に近い状態であることが明らかである (C)。よって、OGD処理前にドネペジルを添加することにより、神経細胞が保護されているということが示された。

次に、前述の試験と同様の操作により、ラット初代培養神経細胞をOGD処理し、その際に各種アセチルコリンエステラーゼ阻害剤 (ガランタミン、タクリン、リバスチグミン) 及びドネペジルを用いてそれぞれの濃度を変えて細胞に添加した際の LDH 放出に及ぼす影響について試験を行った。添加した濃度は、ドネペジル、タクリン及びリバスチグミンは 0.1, 1.0, 10 μ M、ガランタミンは 1.0, 10, 100 μ Mとした。結果を図3に示す。図3 Aより明らかなように、ドネペジルのみが用量依存的に神経細胞のLDH放出を統計上有意に抑制していることが分かる。ここで、それぞれのラット脳破碎懸濁液におけるアセチルコリンエステラーゼ阻害剤の50%阻害濃度 (IC₅₀) を表1に示す。

表 1

AChE 阻害	IC ₅₀ (nM)
ドネペジル	6.7±0.35
ガランタミン	1200±33
タクリン	77±1.4
リバスチグミン	4.3±0.087

Ogura et al. 2000. Comparison of inhibitory activities of Donepezil and other cholinesterase inhibitors on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in vitro. Methods Find Exp Clin Pharmacol. 22, 609-613

表 1 から明らかなように、ドネペジルのアセチルコリンエステラーゼ 50 % 阻害濃度はリバスチグミンとほぼ同等であることが分かる。しかしながら、リバスチグミンや他のアセチルコリンエステラーゼ阻害剤は神経細胞保護作用を示さなかった。この結果は、神経保護作用がアセチルコリンエステラーゼ阻害作用とは異なる作用機序に基づくものであることを示唆している。

次に、ドネペジルの神経細胞保護作用が、アセチルコリン受容体アンタゴニストであるスコポラミン（ムスカリン受容体アンタゴニスト）及びメカミラミン（ニコチン受容体アンタゴニスト）を細胞に添加した際にどのように影響を受けるのかを、以下の実験により調べた。

前述の試験と同様に、OGD 処理の 12 時間前からドネペジル、スコポラミン、メカミラミン、ドネペジルとスコポラミン、もしくは、ドネペジルとメカミラミンを神経細胞培養液中に添加し、OGD 処理による LDH 放出に及ぼす影響について試験を行った。添加した濃度は、ドネペジル、スコポラミン、メカミラミンのいずれも 10 μ M とした。

結果を図 4 に示す。図 4 より明らかなように、ドネペジルの神経細胞保護作用は、Cont（OGD 処理なし）、Vehi（ドネペジル添加なし）及びドネペジル添加

のいずれのサンプルにおいてもアセチルコリン受容体アンタゴニストであるスコ
ポラミン（図 4A）又はメカミラミン（図 4B）の添加の有無によっては影響を受
けていないということが分かる。これは、ドネペジルがアセチルコリン受容体の
阻害の有無に関係なく神経細胞を保護しているということを示す。よって、本実
5 験によりドネペジルはアセチルコリンエステラーゼ阻害作用以外の作用機序によ
って神経細胞保護的に作用していると考えられる。

実施例 2：興奮性毒性試験

本実施例では、NMDA 毒性に対するドネペジルの細胞保護作用を検討した。ラ
10 ット初代培養大脳皮質神経細胞に対して NMDA 刺激を与えることによって細胞
傷害を誘発するというモデルを用いた。実施例 1 のようにして得られたラット初
代培養神経細胞に対して NMDA 100 μ M を添加し、9 時間後に培養液中に存在
する LDH の量を測定した。

本実施例においては、初代培養神経細胞はラット胎仔（胎生 17-19 日齢）の大
15 脳皮質より得た。培養液は、MEM(invitrogen 社製)にブドウ糖（1g/L）、
penici./strept. (100unit/mL)、10% FCS を添加したものをを用いた。培地交換は
2, 3 日毎に行う。KA 毒性を見るときは、培地を Neurobasal Medium(invitrogen
社製)に B-27 とグルタミン 0.25 mM を加えたものをを用いた。細胞は 37℃、5 %
CO₂ 環境下で培養した。7 日以上培養した後、培地に NMDA 100 μ M を加え、
20 37℃、5 % CO₂ 環境下で一晩培養した。ドネペジルは NMDA 刺激を加える 1 2
時間前から細胞に添加した。そして、NMDA 添加 9 時間後に培養液中に存在する
LDH の量を測定し神経保護作用の指標とした。

本実施例の結果を図 5 に示す。図 5 より、ドネペジルが 0.1 μ M から 10 μ M の
範囲で用量依存的に神経細胞の LDH 放出を抑制していることが分かる。本実験
25 により、ドネペジルは NMDA 興奮性毒性に対して濃度依存的に神経細胞保護効
果を示すことが明らかとなった。

実施例 3：興奮性毒性試験

カイニン酸は、アルツハイマー病の原因因子の一つとされている β -アミロイド ($A\beta$) が誘発する神経細胞死を増強するといわれている。本実施例では、カイニン酸をラット初代培養大脳皮質神経細胞に対して与えることによって細胞傷害を誘発するというモデルを用いた。

- 5 本実施例においては、初代培養神経細胞はラット胎仔（胎生 17-19 日齢）の大脳皮質より得た。細胞は 37℃、5 %CO₂ 環境下で培養した。7 日以上培養した後、培地に NMDA またはカイニン酸を加え、37℃、5 %CO₂ 環境下で一晩培養した。ドネペジルは、カイニン酸刺激を加える 24 時間前から細胞に添加した。そしてカイニン酸添加 24 時間後に培養液中に存在する LDH の量を測定し神経
- 10 保護作用の指標とした。

本実施例の結果を図 6 に示す。図 6 より、ドネペジルが 0.1 μ M から 1 μ M の範囲で用量依存的に神経細胞の LDH 放出を抑制していることが分かる。本実験によりドネペジルはカイニン酸興奮性毒性に対して濃度依存的に保護効果を示すことが明らかとなった。

15

以下の実施例 4～7 において使用した試薬及び統計解析法は以下の通りである。

- $A\beta$ (Human, 1-40) はペプチド研 (Osaka, Japan) から購入した。Trypsin solution, penicillin, streptomycin, Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), HEPES は Life Technologies Inc. (Grand Island, NY) から購入した。
- 20 Insulin, sodium selenite, putrescine, DNase I, mecamlamine, scopolamine は Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) から購入した。Fetal calf serum と heat-inactivated horse serum は Nichirei Co. (Tokyo, Japan) から購入した。
- ChAT, microtubule associated protein-2 (MAP2) は Chemicon International Inc. (Temecula, CA) から購入した。Alexa Fluor 546 は Molecular Probes (Eugene,
- 25 OR) から購入した。Vecstain Elite ABC kit, diaminobenzidine (DAB) kit は Vector Laboratories, Inc. (Burlingame, CA) から購入した。Lipofectamine 2000 は Invitrogen Co. (Carlsbad, CA) から購入した。siRNA は日本バイオサービス (Saitama, Japan) に合成を依頼した。

統計解析のデータは平均値±標準誤差で表示した。比較検定は Welch's t-test を用いた。p<0.05 を有意差ありとした。統計解析ソフトは SAS 8.1 (SAS Institute Japan Ltd., Tokyo, Japan)を用いた。

- 5 実施例 4：中隔野神経細胞の培養及びコリン作動性神経であることの確認
- 中隔野神経細胞はウイスターラット（日本チャールズリバー）の胎仔（胎生 18 日齢）から調製した。胎仔脳から中隔部位（中隔野および前脳基底核を含む）を切り出し、0.25 %トリプシンと 0.2 mg/ml DNase I を含む $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -free Hanks' balanced salt solution 中で、37 °C で 15 分間インキュベーションした。
- 10 得られた細胞に、10 % fetal calf serum, 10 % horse serum を加えた DMEM (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ insulin, 30 nmol/L sodium selenite, 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ putrecine, 20 nmol/L progesterone, 15 nmol/L biotin, 100 units/ml penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin, 1 mmol/L sodium pyruvate を含む)を加えてトリプシンを失活させ、細胞を 2 回洗浄した。96-well の poly-D-lysine-coated culture plates に、1.2
- 15 $\times 10^5$ cells/well の濃度で細胞を蒔いた。播種した細胞を CO_2 インキュベーター (5 % CO_2 , 37 °C)で培養した。1 日後、5 % fetal calf serum を含む上記 DMEM で培地の 3 分の 2 を交換した。3 日後に、再び 5 % fetal calf serum を含む上記 DMEM で培地の 3 分の 2 を交換した。6 日後に、血清を含まない上記 DMEM (但し、Gln は含まない) で培地を全量交換した。
- 20 以上の方法で培養した中隔野神経細胞を、抗コリンアセチルトランスフェラーゼ(ChAT)抗体で免疫染色した。まず、培養した中隔野神経細胞を中性ホルマリン溶液で 60 分間固定した。5%ヤギ血清で 30 分間インキュベーションした後、1%ヤギ血清存在下で 500 倍希釈の ChAT 抗体で 1 日間インキュベーションした。続いて、細胞を 500 倍希釈の goat anti-rabbit IgG 及び HRP labeled
- 25 avidin-biotin complex で 1 時間インキュベーションした後、Peroxidase の基質として DAB を用いて細胞を染色した。

培養ラット中隔野神経細胞を抗 ChAT 抗体で免疫染色した結果を図 7 に示す。図 7 のスケールバーは 0.1 mm を示す。免疫染色により、培養ラット中隔野神経

細胞の多くはアセチルコリン合成酵素であるコリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) を有することが示された。このことは、培養ラット中隔野神経細胞がコリン作動性神経であることを意味している。つまり、当該細胞がコリン作動性神経であることが確認できた。

- 5 これまでに、アルツハイマー患者脳におけるコリンアセチルトランスフェラーゼの減少は、認知障害の重さと相関があることが報告されている (Perry E.K., Tomlinson B.E., Blessed G., Bergman K., Gibson P.H. and Perry R.H. (1978) Correlation of cholinergic abnormalities with senile senile plaques and mental test scores in senile dementia. Br. Med. J. 2, 1457-1459.)。従って、中隔野神経細胞傷害の抑制の程度はアルツハイマー病患者での認知機能低下抑制につながる
10 といえる。

実施例 5 : A β (1-40) 毒性に対するドネペジルの保護効果及び細胞死実験

- 細胞障害の指標として、LDH(lactate dehydrogenase)を測定した。細胞には、
15 実施例 4 の培養方法に従って 7 日間培養した中隔野神経細胞を用いた。中隔野神経細胞の培養培地に 15 μ mol/L の A β (1-40) を添加し、CO₂ インキュベーター (5 % CO₂, 37 °C) で培養した。ドネペジル (0.01, 0.1, 1, 10 μ mol/L)、メカミラミン (10 μ mol/L)、スコポラミン (10 μ mol/L) は A β (1-40) 添加の 24 時間前に加えた。A β (1-40) の添加 48 時間後に、培地中の lactate dehydrogenase (LDH) 活性を測定
20 した。同時に、細胞を 0.5 % Triton X-100 を含む phosphate buffer (pH 7.4) で可溶化し、細胞中の LDH も測定した。全体の LDH (細胞内及び培地中) の内、培地中に漏出した LDH の量を計算し、% で表した (Koh J.Y. and Choi D.W. (1987) Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. J. Neurosci. Meth. 20, 83-90.)。データは ANOVA 及び Welch's t-test の解析手法で解析した。
25

結果を図 8 に示す。図 8 中、白カラムは A β を加えない細胞を示し、灰色カラムは A β を加えた細胞を示す。それぞれの値を平均値 \pm S. E. M. (n = 23-25) で求めてグラフ化した。図 8 の「*」は P < 0.05、「**」は P < 0.01、及び「**

*」は $P < 0.001$ であることを示す（「control cells」を対照とする）。

培養した中隔野神経細胞は $A\beta$ (1-40)で障害を受けやすかった（図8「control cells」）。 $A\beta$ (1-40)を48時間加えたときの毒性に対して、ドネペジルは $0.1 \mu\text{mol/L}$ から有意に保護効果を示した（図8）。ドネペジルによる $A\beta$ (1-40)毒性の抑制効果は、アセチルコリン受容体拮抗剤であるメカミラミン及びスコポラミンで阻害されなかった（図8）。

次に、上記のように $A\beta$ (1-40)で処置した培養マウス中隔野神経細胞を、抗MAP2抗体で免疫染色した。MAP2は神経細胞のマーカーとして用いられている（Herzog W. and Weber K. (1978) Fractionation of brain microtubule-associated proteins. Isolation of two different proteins which stimulate tubulin polymerization in vitro. Eur J Biochem. 92(1), 1-8）。MAP2染色は、上記実施例4の免疫染色の方法に準じて行い、中隔野神経細胞に $15 \mu\text{mol/L}$ の $A\beta$ (1-40)を48時間添加後、細胞を固定して免疫染色した。ドネペジルは $A\beta$ (1-40)添加の24時間前から加えた。細胞を固定した後、300倍に希釈した抗MAP2抗体で一日間インキュベーションし、Alexa Fluor546を蛍光基質として用いて検出した。

結果を図9に示す。スケールバーは 0.1 mm を示す。Aは $A\beta$ (1-40)を加えないコントロールの細胞を示す。Bは $A\beta$ (1-40)を加えた細胞を示す。C, D, Eはそれぞれ $A\beta$ (1-40)とドネペジル($0.1, 1, 10 \mu\text{mol/L}$)とを加えた細胞を示す。左側の写真はHoffman modulationによる明視野の写真である。右側の写真は蛍光の写真である。 $A\beta$ (1-40)を48時間加えると、MAP2に染色される神経細胞が減少した（図9B）。ドネペジルは、 $A\beta$ (1-40)によるMAP2染色細胞の障害を抑制することが認められた（図9）。

25 実施例6： $A\beta$ (1-40)の凝集に対するドネペジルの効果

培養液中での $A\beta$ (1-40)の構造状態を検討するためにCDスペクトルを測定した。 $A\beta$ は β -シート構造をとると $A\beta$ 繊維の固まりを形成しやすくなり、毒性を示すことが知られている(Howlett D.R., Jennings K.H., Lee D.C., Clark M.S.,

Brown F., Wetzel R., Wood S.J., Camilleri P. and Roberts G.W. (1995) Aggregation state and neurotoxic properties of Alzheimer beta-amyloid peptide. *Neurodegeneration*. 4, 23-32.)。また、 $A\beta$ (1-40)が α -ヘリックス構造または β -シート構造をとると、205 nm から 225 nm における CD(circular dichroism) スペクトルが減少することが知られている (Sreerama N., Venyaminov S.Y. and Woody R.W. (2000) Estimation of peptide secondary structure from circular dichroism spectra: inclusion of denatured peptides with native peptides in the analysis. *Anal. Biochem.* 287, 243-251, Bokvist M., Lindstrom F., Watts A. and Grobner G. (2004) Two types of Alzheimer's beta-amyloid (1-40) peptide membrane interactions: aggregation preventing transmembrane anchoring versus accelerated surface fibril formation. *J. Mol. Biol.* 335, 1039-49.)。特に、 β -シート構造の形成は 215 nm 周辺の CD スペクトルを減少させることが知られている。そこで、 $A\beta$ の凝集の指標として、CD を測定した。

培養した中隔野神経細胞に 15 μ mol/L の $A\beta$ (1-40)を加え、添加 48 時間後に培地を採取し、215 nm~260 nm の CD スペクトルを測定した。CD スペクトル測定には JASCO (日本分光、J-720WI)を使用した。

結果を図 10 に示す。A は donepezil を加えない細胞を示す。B は donepezil (10 μ M)を加えた細胞を示す。実線は $A\beta$ を加えない細胞、破線は $A\beta$ を加えた細胞を示す。また、A2 及び B2 は、それぞれ A 及び B グラフの破線の値から実線の値を引いたものを示した。10 μ mol/L のドネペジル添加により、215 nm から 225 nm において CD スペクトルの減少が抑制された。従って、本実施例により、 $A\beta$ が α -ヘリックス構造又は β -シート構造を形成するのを、ドネペジルが抑制することが示された。

実施例 7 : siRNA の細胞内アセチルコリン活性に対する効果及び $A\beta$ (1-40) 毒性に対する保護効果

(1) siRNA 処理

アセチルコリンエステラーゼの二本鎖 siRNA として下記の 2 組のオリゴヌクレオチド (i) 及び(ii) を用いた。

- (i) ; 5'-AAUGUCAGUGACUCUGUUUTT-3' (配列番号 1) 、
5'-AAACAGAGUCACUGACAUUTT-3' (配列番号 2) 及び
5 (ii) ; 5'-GCUGCCUCAAGAAAGUAUCTT-3' (配列番号 3) 、
5'-GAUACUUUCUUGAGGCAGCTT-3' (配列番号 4) 。

中隔野神経細胞の培養 6 日目と 7 日目に、 $1\mu\text{mol/L}$ の上記(i)及び(ii)の siRNA と lipofectamine2000 ($0.4\mu\text{L/mL}$) とを培地中に加えた。培養 9 日目に、細胞を可溶化し、細胞内のアセチルコリンエステラーゼ活性 (AChE 活性) を測定した。

10 (2) アセチルコリンエステラーゼ活性の測定

アセチルコリンエステラーゼ活性の測定は、Ellman らの方法に従って行った (Ellman G.L., Courtney K.D., Anders V.J., Feather-Stone R.M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol. 7, 88-95) 。細胞を 0.5 % Triton X-100 を含むリン酸緩衝液(pH 8.0)で可溶化した。得られた細胞可溶化溶液を遠心分離し、上澄みをリン酸緩衝液(pH 8.0)で 3 倍希釈した。希釈した上清に、5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (0.33 mmol/L) と acetylthiocholine iodide (AthCh) (0.5 mmol/L)とを添加し、
15 攪拌した後、 412 nm での吸光度の増加を測定した (Molecular Devices, SpectraMax 190EXT) 。データは ANOVA と Welch's t-test で解析した。

20 結果を図 1 1 に示す。それぞれの値を平均値 \pm S. E. M. ($n = 11$)の形式でグラフ化した($n=11$)。図 1 1 中、siRNA 無添加細胞に対して、「**」は $P < 0.01$ を、「***」は $P < 0.001$ であることを示す。

2 種類の siRNA、(i)及び(ii)を検討した結果、ともに AChE 活性の抑制効果が認められた (図 1 1) 。

25 (3) $A\beta$ (1-40)毒性に対する siRNA の保護効果

細胞障害の指標として LDH(lactate dehydrogenase)を測定した。中隔野神経細胞に $15\mu\text{mol/L}$ の $A\beta$ (1-40)を培養 7 日目に添加し、4 8 時間インキュベートした。 $1\mu\text{mol/L}$ の siRNA は $A\beta$ (1-40)添加の 2 4 時間前と直前に加えた。白力

ラムは A β (1-40)を加えない細胞を示す。灰色カラムは A β (1-40)を加えた細胞を示す。データは ANOVA と Welch's t-test で解析した。

結果を図 1 2 に示す。それぞれの値を平均値 \pm S. E. M.の形式でグラフ化した (n=7)。図 1 2 中、siRNA 無添加細胞に対して、「***」は P < 0.001 であることを示す。

上記の 2 種類の siRNA ((i)及び(ii)) の効果を検討した結果、ともに A β 毒性を抑制した (図 1 2)。

LDH の測定と並行して、A β の凝集を 215 nm \sim 260 nm における CD スペクトルの変化で解析した。

10 結果を図 1 3 に示す。A は RNAi を加えた細胞を示す。実線は A β を加えない細胞、破線は A β を加えた細胞を示す。B は、A の破線の値から実線の値を引いた値を示す。siRNA の添加により CD スペクトルの 215 nm から 225 nm の減少が抑制された (図 1 3)。

15 産業上の利用の可能性

本願発明に係る神経細胞保護剤は、虚血様細胞傷害および興奮性毒性による傷害に対して神経細胞保護的に働く。よって、本願発明に係る神経細胞保護剤によって脳梗塞や脳血栓等により誘発される虚血性神経細胞死および興奮性毒性により誘発される神経細胞死を防止、抑制することができる。

20

配列表フリーテキスト

配列番号 1 : siRNA

配列番号 2 : siRNA

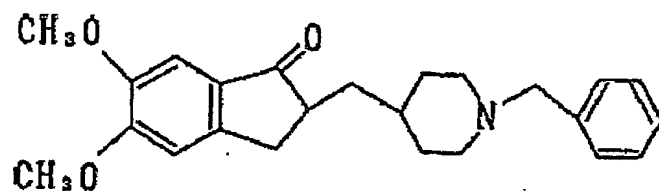
配列番号 3 : siRNA

25 配列番号 4 : siRNA

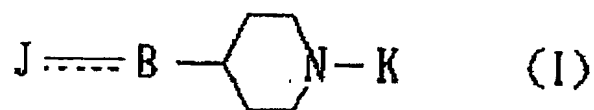
請求の範囲

1. 以下の(i)～(vii)で表されるいずれかの化合物を含有する、中枢神経系の神経細胞保護剤。

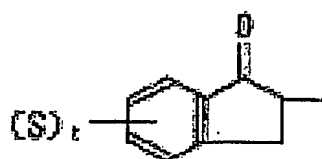
- 5 (i) 下記化学式で表される 1-ベンジル-4-[(5,6-ジメトキシ-1-インダノン)-2-イル]メチルピペリジン又はその薬理学的に許容できる塩。



- 10 (ii) 次の一般式 (I) で表される環状アミン誘導体又はその薬理学的に許容できる塩。



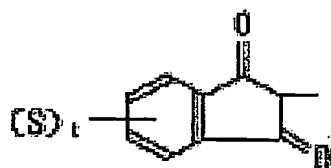
〔式中、J は下記式



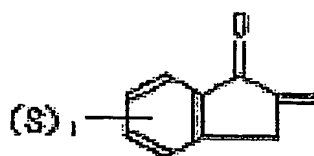
インダノニル



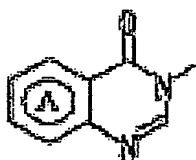
インデニル



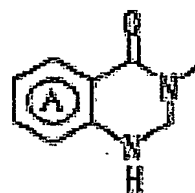
インダンジオニル



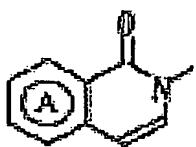
インダノリデニル



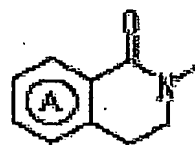
(a)



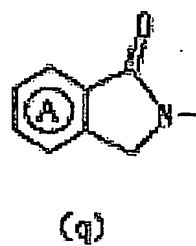
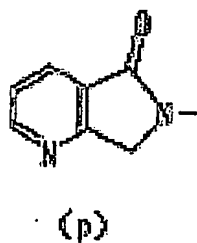
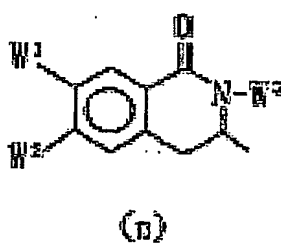
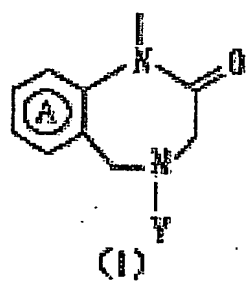
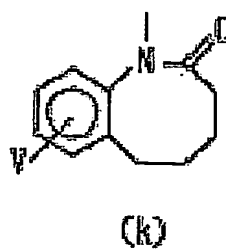
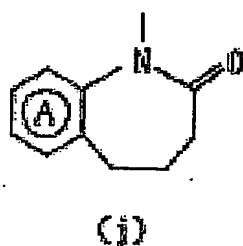
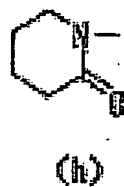
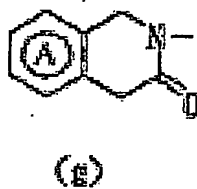
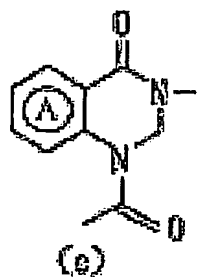
(b)



(c)



(d)

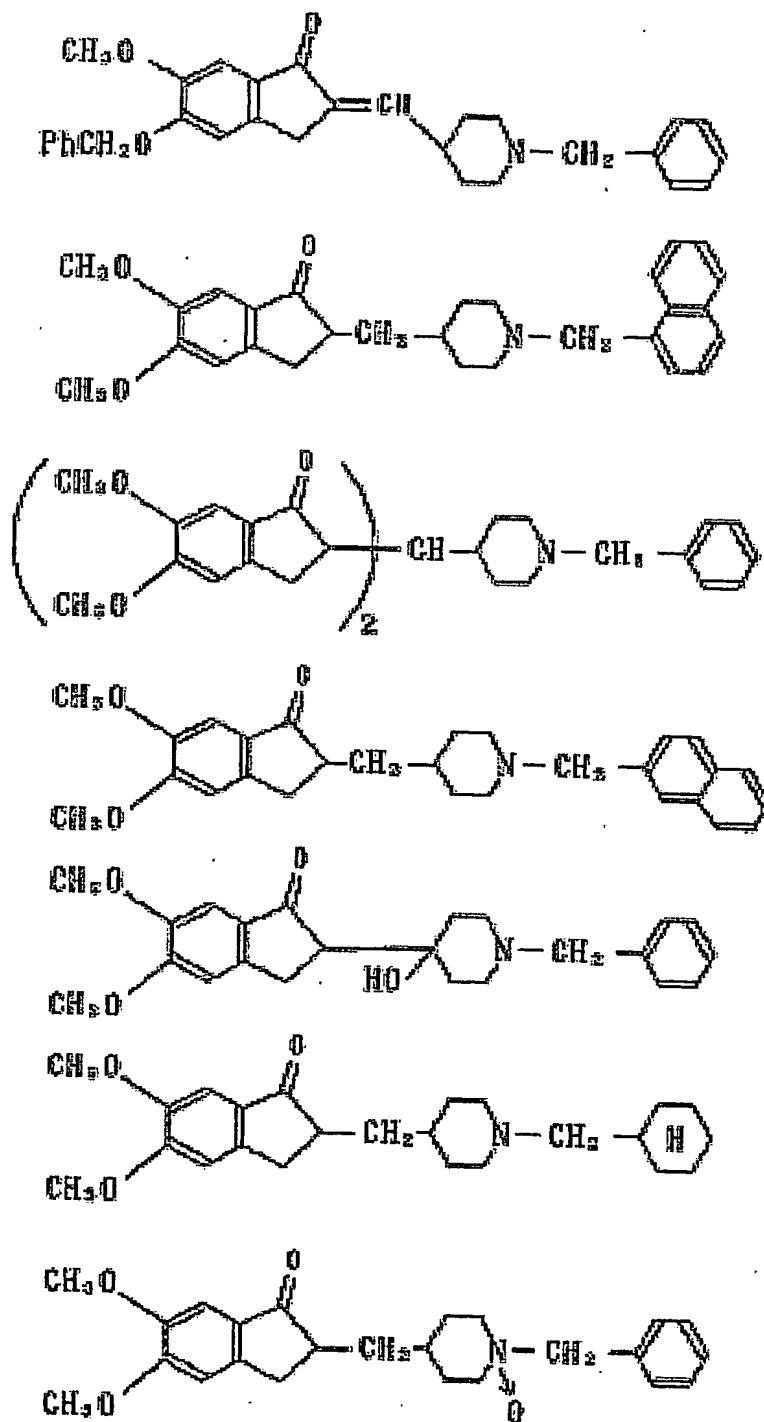


(式中、S は炭素数 1 ～ 6 の低級アルキル基、炭素数 1 ～ 6 の低級アルコキシ基、ハロゲン原子又は水酸基を意味する。t は 0 又は 1 ～ 4 の整数を意味する。更に (S)_t は結合しているフェニル環の隣りあう炭素間で

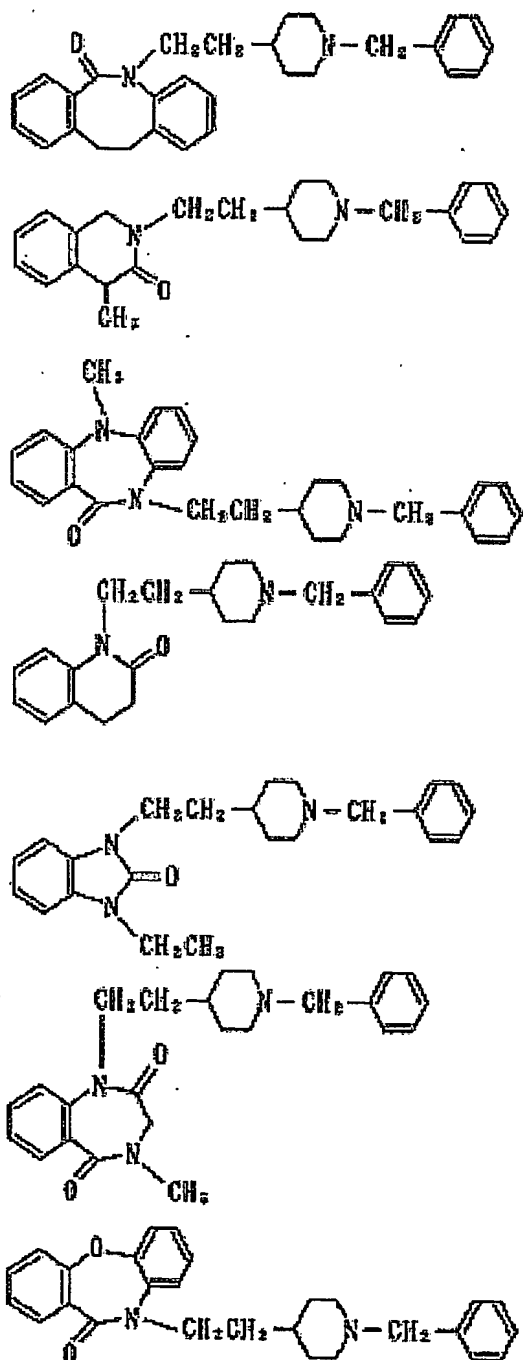
メチレンジオキシ基又はエチレンジオキシ基を形成していてもよい。式 (l) における Y は水素原子又は炭素数 1～6 の低級アルキル基を意味し、式 (k) における V は水素原子又は炭素数 1～6 の低級アルコキシ基、式 (n) における W¹ 及び W² は、互いに独立し、同一又は異なって、水素原子、炭素数 1～6 の低級アルキル基又は炭素数 1～6 の低級アルコキシ基、W³ は水素原子又は炭素数 1～6 の低級アルキル基を意味する。式 (a)～(e), (g), (j), (l) 及び (q) におけるフェニル環 A は炭素数 1～6 のアルキル基又は炭素数 1～6 のアルコキシ基によって置換されていてもよい。) で表される基から選択された一価又は二価の基を意味する。B は式 $-(CHR^2)_n-$ (式中、n は 0 又は 1～10 の整数、R² はそれぞれ独立に水素原子又はメチル基を意味する) で示される基、式 $=(CH-CH=CH)_b-$ (式中、b は 1～3 の整数を意味する) で示される基、式 $=CH-(CH_2)_c-$ (式中、c は 0 又は 1～9 の整数を意味する) で示される基、又は式 $=(CH-CH)_d=$ (式中、d は 0 又は 1～5 の整数を意味する) で示される基を意味する。K は置換基として、ハロゲン化されていてもよい炭素数 1～6 のアルキル基、炭素数 1～6 のアルコキシ基、ニトロ基、ハロゲン原子、カルボキシ基、ベンジロキシ基、炭素数 1～6 のアルコキシカルボニル基、アミノ基、炭素数 1～6 のモノアルキルアミノ基、炭素数 1～6 のジアルキルアミノ基、カルバモイル基、炭素数 1～6 のアシルアミノ基、シクロヘキシルオキシカルボニル基、炭素数 1～6 のアルキルアミノカルボニル基、炭素数 1～6 のアルキルカルボニルオキシ基、水酸基、ホルミル基又はアルコキシ (炭素数 1～6) アルキル (炭素数 1～6) 基を有していてもよいフェニルアルキル基を意味する。

— は単結合もしくは二重結合を意味する。

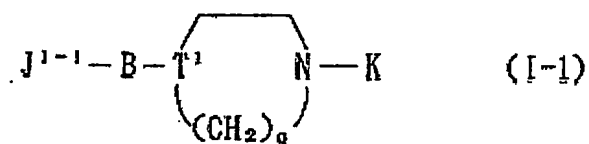
(iii) 下記式で表される化合物群から選択される環状アミン誘導体又はその薬理学的に許容できる塩。



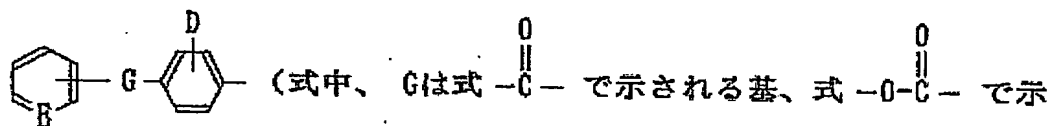
(iv) 下記式で表される化合物群から選択される環状アミン誘導体又はその薬理学的に許容できる塩。



(v) 次の一般式(I-1) で表される環状アミン誘導体又はその薬理学的に許容できる塩。



〔式中、J¹⁻¹ は炭素数 1～6 の低級アルキル基（以下単に低級アルキル基という）；シクロヘキシル基；置換基として低級アルキル基、炭素数 1～6 の低級アルコキシ基（以下単に低級アルコキシ基という）、ニトロ基、ハロゲン、カルボキシル基、低級アルコキシカルボニル基、アミノ基、モノ低級アルキルアミノ基、ジ低級アルキルアミノ基、カルバモイル基、炭素数 1～6 の脂肪族飽和モノカルボン酸から誘導されるアシルアミノ基、シクロヘキシルオキシカルボニル基、低級アルキルアミノカルボニル基、低級アルキルカルボニルオキシ基、ハロゲン化低級アルキル基、水酸基、ホルミル基又は低級アルコキシ低級アルキル基を有していてもよいフェニル基、ピリジル基あるいはピラジル基；式

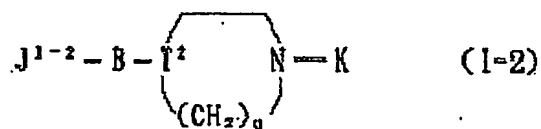


される基、式 $-\text{O}-$ で示される基、式 $-\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-$ で示される基、式 $-\text{CH}_2-\text{O}-$ で示される基、式 $-\text{CH}_2-\text{SO}_2-$ で示される基、式 $-\text{CH}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{OH}}$ で示される基又は式 $-\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{S}}-$ で示される基を意味する。B は炭素原子又は窒素原子を意味する。）

で示される基；キノリル基；キノキサリル基；フリル基又は式 $\text{R}^1-\text{CH}=\text{CH}-$ （式中、R¹ は水素原子又は低級アルコキシカルボニル基を意味する）で示される基を意味する。B は式 $-(\text{CH}_2)_n-$ で示される基、式 $-\text{NR}^2-(\text{CH}_2)_n-$ （式中、R² は水素原子、低級アルキル基、フェニル基又は低級アルキルスルホニル基を意味する）で示される基、式 $-\text{CONR}^3-(\text{CH}_2)_n-$ （式中、R³ は水素原子、低級アルキル基、置換基として低級アルキル基、低級アルコキシ基、ハロゲン又は水酸基を有しても

よいフェニル基、ベンジル基又はピリジル基を意味する)で示される基、式 $\text{-NH}\cdot\text{CO}\cdot(\text{CH}_2)_n\cdot$ で示される基、式 $\text{-CH}_2\cdot\text{CO}\cdot\text{NH}\cdot(\text{CH}_2)_n\cdot$ で示される基、式 $\text{-CO}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CH}(\text{OH})\cdot\text{CH}_2\cdot$ で示される基、式 $\text{-CO}\cdot(\text{CH}_2)_n\cdot$ で示される基、式 $\text{-C}(\text{OH})\cdot(\text{CH}_2)_n\cdot$ で示される基又は式 $\text{-CO}\cdot\text{CH}=\text{CH}\cdot\text{CH}_2\cdot$ で示される基 (以上の式中、 n は 0 又は 1 ~ 10 の整数を意味する) を意味する。 T^1 は炭素原子を意味する。 K はフェニル基が置換基として低級アルキル基、低級アルコキシ基、ニトロ基、ハロゲン、カルボキシ基、低級アルコシカルボニル基、アミノ基、モノ低級アルキルアミノ基、ジ低級アルキルアミノ基、カルバモイル基、炭素数 1 ~ 6 の脂肪族飽和モノカルボン酸から誘導されるアシルアミノ基、シクロヘキシルオキシカルボニル基、低級アルキルアミノカルボニル基、低級アルキルカルボニルオキシ基、ハロゲン化低級アルキル基、水酸基、ホルミル基又は低級アルコキシ低級アルキル基を有していてもよいフェニルアルキル (アルキルの炭素数 1 ~ 2) 基; シンナミル基; 低級アルキル基; ピリジルメチル基; シクロアルキル (シクロアルキルの炭素数 3 ~ 6) アルキル基; アダマンタンメチル基; フルフリル基; 炭素数 3 ~ 6 のシクロアルキル基又はアシル基を意味する。 q は 1 又は 2 を意味する。

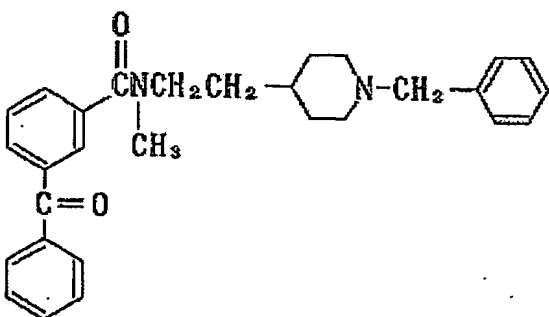
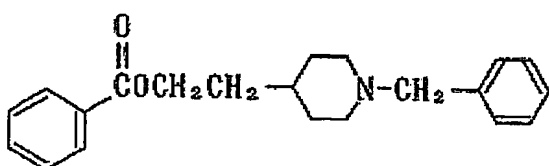
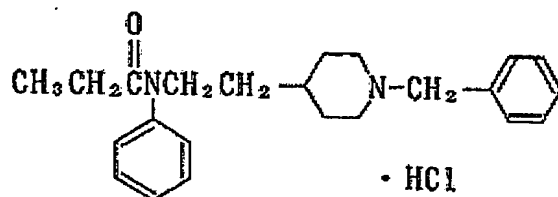
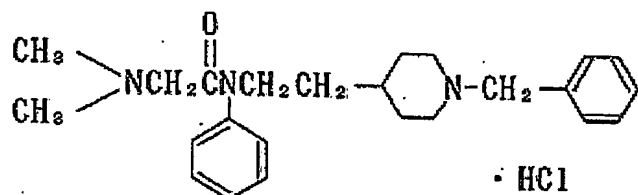
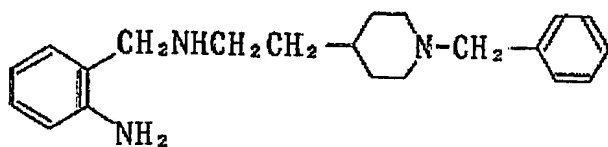
(vi) 次の一般式(I-2) で表される環状アミン誘導体又はその薬理学的に許容できる塩。

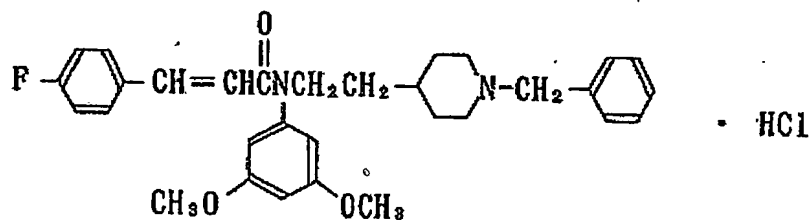
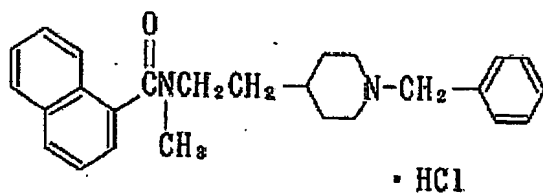
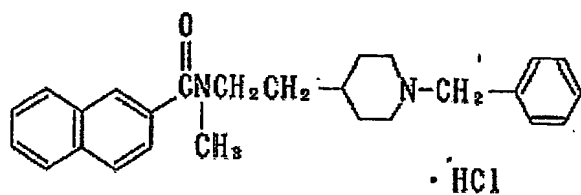
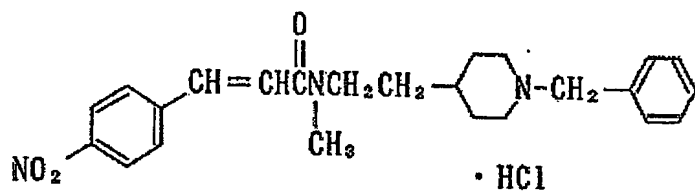
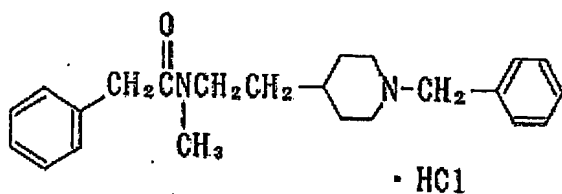
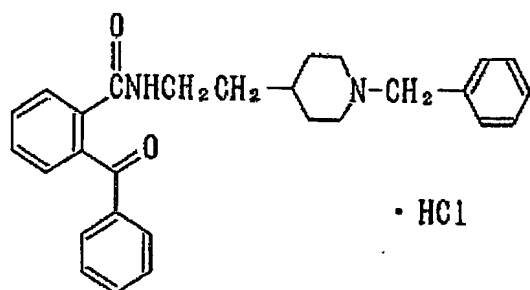


[式中、 J^{1-2} は置換基として炭素数 1 ~ 6 の低級アルキル基又は炭素数 1 ~ 6 の低級アルコキシ基を有してもよいインダノニル基を意味する。 T^2 は窒素原子を意味する。 B , K 及び q は前記の意味を有する。]

(vii) 下記式で表される化合物群から選択される環状アミン誘導体又はその

薬理学的に許容できる塩。

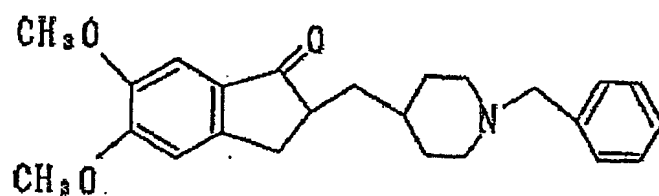




2. 塩が塩酸塩である請求項1記載の保護剤。

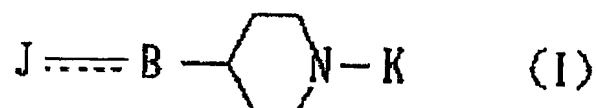
3. 以下の(i)~(vii)で表されるいずれかの化合物を含有する、中枢神経系の神経細胞障害の予防剤及び／又は治療剤。

- (i) 下記化学式で表される 1-ベンジル-4-[(5,6-ジメトキシ-1-インドノン)-2-イル]メチルピペリジン又はその薬理学的に許容できる塩。

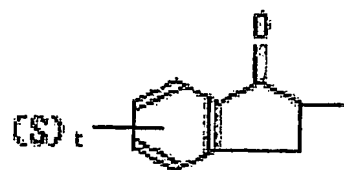


5

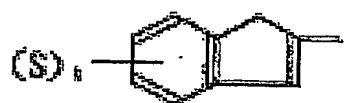
- (ii) 次の一般式 (I) で表される環状アミン誘導体又はその薬理学的に許容できる塩。



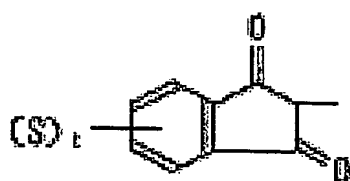
〔式中、J は下記式



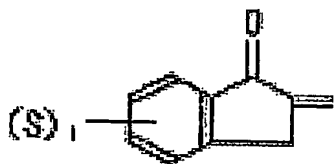
インダノニル



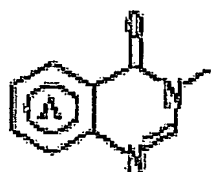
インデニル



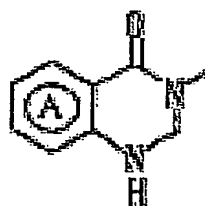
インダンジオニル



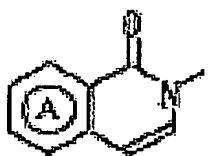
インダノリデニル



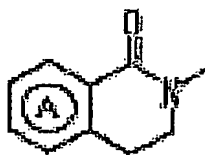
(a)



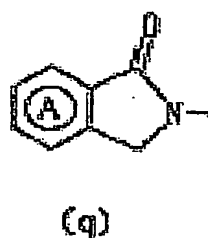
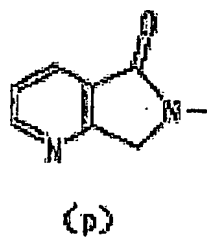
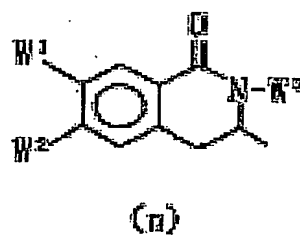
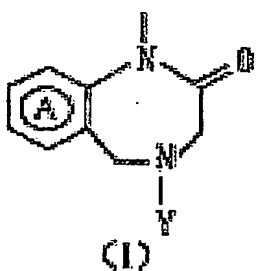
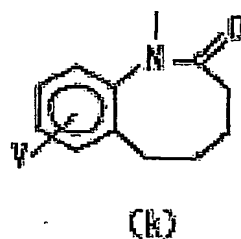
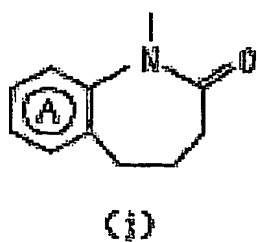
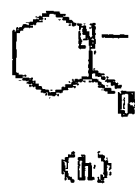
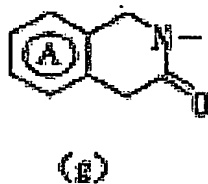
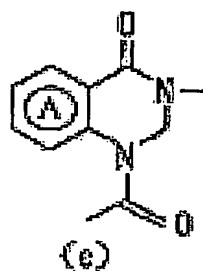
(b)



(c)



(d)

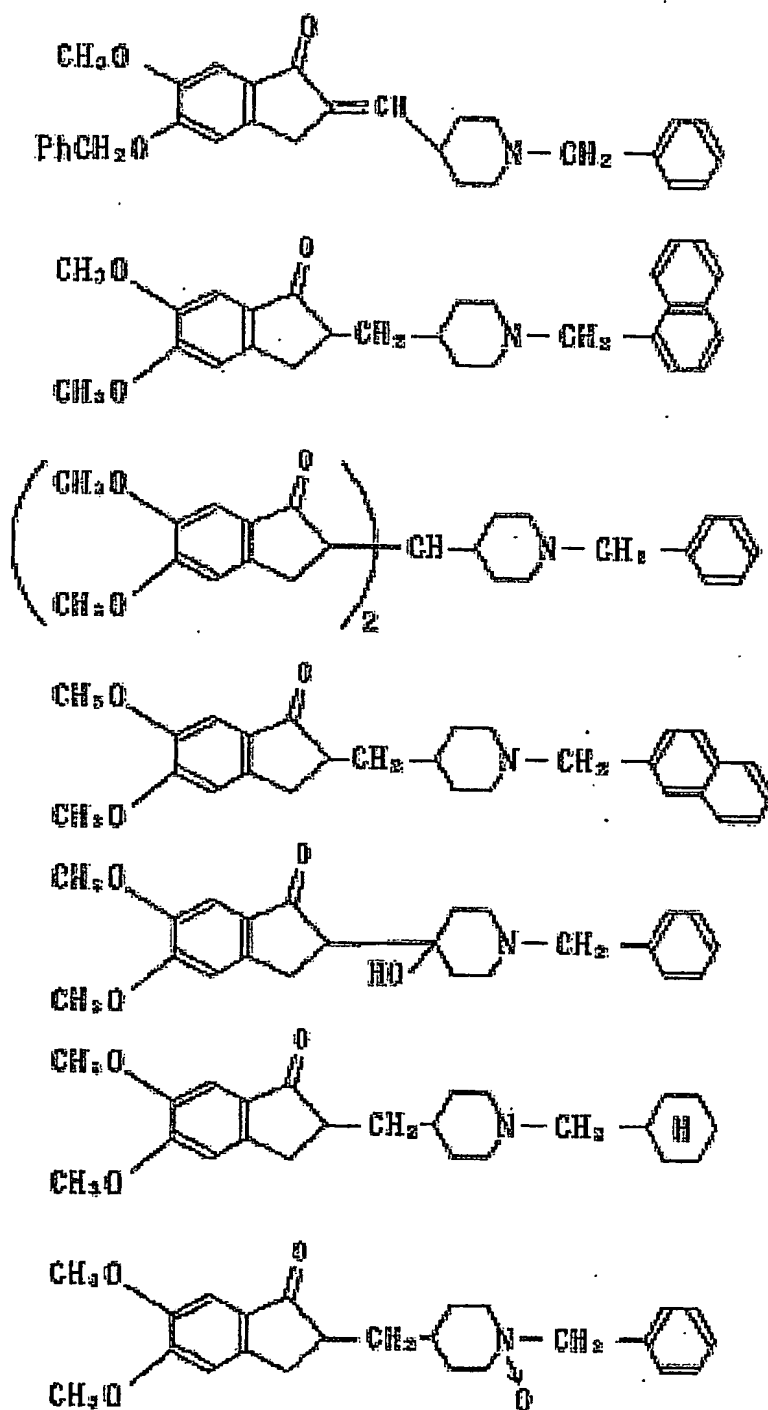


(式中、S は炭素数 1～6 の低級アルキル基、炭素数 1～6 の低級アルコキシ基、ハロゲン原子又は水酸基を意味する。t は 0 又は 1～4 の整数を意味する。更に (S)_t は結合しているフェニル環の隣りあう炭素間でメチレンジオキシ基又はエチレンジオキシ基を形成していてもよい。式

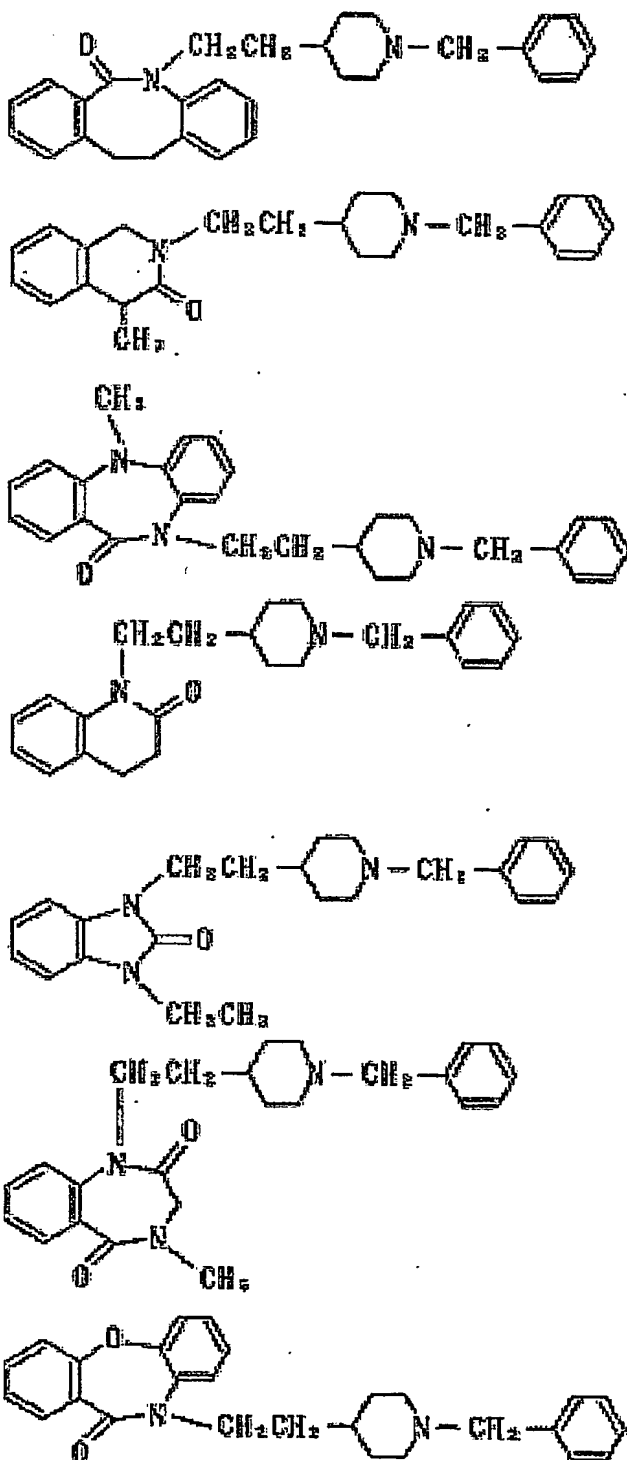
(l) における Y は水素原子又は炭素数 1～6 の低級アルキル基を意味し、式(k) における V は水素原子又は炭素数 1～6 の低級アルコキシ基、式(n) における W¹ 及び W² は、互いに独立し、同一又は異なって、水素原子、炭素数 1～6 の低級アルキル基又は炭素数 1～6 の低級アルコキシ基、W³ は水素原子又は炭素数 1～6 の低級アルキル基を意味する。式(a)～(e), (g), (j), (l) 及び (q) におけるフェニル環 A は炭素数 1～6 のアルキル基又は炭素数 1～6 のアルコキシ基によって置換されていてもよい。) で表される基から選択された一価又は二価の基を意味する。B は式 $-(CHR^2)_n-$ (式中、n は 0 又は 1～10 の整数、R² はそれぞれ独立に水素原子又はメチル基を意味する) で示される基、式 $=(CH-CH=CH)_b-$ (式中、b は 1～3 の整数を意味する) で示される基、式 $=CH-(CH_2)_c-$ (式中、c は 0 又は 1～9 の整数を意味する) で示される基、又は式 $=(CH-CH)_d=$ (式中、d は 0 又は 1～5 の整数を意味する) で示される基を意味する。K は置換基として、ハロゲン化されていてもよい炭素数 1～6 のアルキル基、炭素数 1～6 のアルコキシ基、ニトロ基、ハロゲン原子、カルボキシ基、ベンジルオキシ基、炭素数 1～6 のアルコキシカルボニル基、アミノ基、炭素数 1～6 のモノアルキルアミノ基、炭素数 1～6 のジアルキルアミノ基、カルバモイル基、炭素数 1～6 のアシルアミノ基、シクロヘキシルオキシカルボニル基、炭素数 1～6 のアルキルアミノカルボニル基、炭素数 1～6 のアルキルカルボニルオキシ基、水酸基、ホルミル基又はアルコキシ (炭素数 1～6) アルキル (炭素数 1～6) 基を有していてもよいフェニルアルキル基を意味する。

— は単結合もしくは二重結合を意味する。

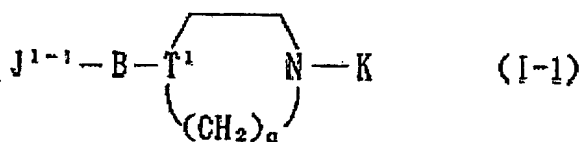
(iii) 下記式で表される化合物群から選択される環状アミン誘導体又はその薬理学的に許容できる塩。



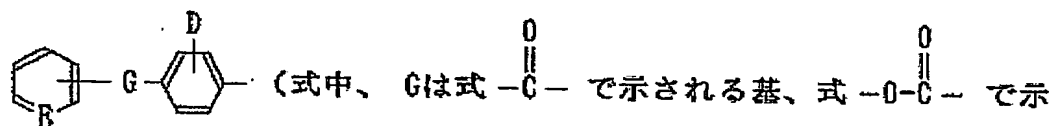
(iv) 下記式で表される化合物群から選択される環状アミン誘導体又はその薬理学的に許容できる塩。



(v) 次の一般式(I-1) で表される環状アミン誘導体又はその薬理学的に許容できる塩。



〔式中、J¹⁻¹ は炭素数 1～6 の低級アルキル基（以下単に低級アルキル基という）；シクロヘキシル基；置換基として低級アルキル基、炭素数 1～6 の低級アルコキシ基（以下単に低級アルコキシ基という）、ニトロ基、ハロゲン、カルボキシル基、低級アルコキシカルボニル基、アミノ基、モノ低級アルキルアミノ基、ジ低級アルキルアミノ基、カルバモイル基、炭素数 1～6 の脂肪族飽和モノカルボン酸から誘導されるアシルアミノ基、シクロヘキシルオキシカルボニル基、低級アルキルアミノカルボニル基、低級アルキルカルボニルオキシ基、ハロゲン化低級アルキル基、水酸基、ホルミル基又は低級アルコキシ低級アルキル基を有していてもよいフェニル基、ピリジル基あるいはピラジル基；式

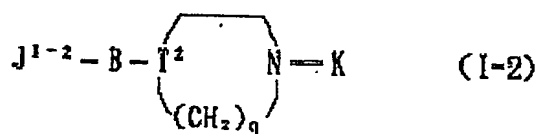


される基、式 $\text{---}\text{O}\text{---}$ で示される基、式 $\text{---}\text{CH}_2\text{---}\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{N}}\text{---}\text{C}\text{---}$ で示される基、式 $\text{---}\text{CH}_2\text{---}\text{O}\text{---}$ で示される基、式 $\text{---}\text{CH}_2\text{---}\text{SO}_2\text{---}$ で示される基、式 $\text{---}\underset{\text{OH}}{\underset{|}{\text{CH}}}\text{---}$ で示される基又は式 $\text{---}\underset{\text{O}}{\underset{\uparrow}{\text{S}}}\text{---}$ で示される基を意味する。B は炭素原子又は窒素原子を意味する。）

で示される基；キノリル基；キノキサリル基；フリル基又は式 $\text{R}^1\text{---CH=CH}\text{---}$ （式中、R¹ は水素原子又は低級アルコキシカルボニル基を意味する）で示される基を意味する。B は式 $\text{---}(\text{CH}_2)_n\text{---}$ で示される基、式 $\text{---NR}^2\text{---}(\text{CH}_2)_n\text{---}$ （式中、R² は水素原子、低級アルキル基、フェニル基又は低級アルキルスルホニル基を意味する）で示される基、式 $\text{---CONR}^3\text{---}(\text{CH}_2)_n\text{---}$ （式中、R³ は水素原子、低級アルキル基、置換基として低級アルキル基、低級アルコキシ基、ハロゲン又は水酸基を有しても

よいフェニル基、ペンジル基又はピリジル基を意味する)で示される基、式 $\text{-NH}\cdot\text{CO}\cdot(\text{CH}_2)_n\cdot$ で示される基、式 $\text{-CH}_2\cdot\text{CO}\cdot\text{NH}\cdot(\text{CH}_2)_n\cdot$ で示される基、式 $\text{-CO}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CH}(\text{OH})\cdot\text{CH}_2\cdot$ で示される基、式 $\text{-CO}\cdot(\text{CH}_2)_n\cdot$ で示される基、式 $\text{-C}(\text{OH})\cdot(\text{CH}_2)_n\cdot$ で示される基又は式 $\text{-CO}\cdot\text{CH}=\text{CH}\cdot\text{CH}_2\cdot$ で示される基 (以上の式中、 n は 0 又は 1 ~ 10 の整数を意味する) を意味する。 T^1 は炭素原子を意味する。 K はフェニル基が置換基として低級アルキル基、低級アルコキシ基、ニトロ基、ハロゲン、カルボキシ基、低級アルコキシカルボニル基、アミノ基、モノ低級アルキルアミノ基、ジ低級アルキルアミノ基、カルバモイル基、炭素数 1 ~ 6 の脂肪族飽和モノカルボン酸から誘導されるアシルアミノ基、シクロヘキシルオキシカルボニル基、低級アルキルアミノカルボニル基、低級アルキルカルボニルオキシ基、ハロゲン化低級アルキル基、水酸基、ホルミル基又は低級アルコキシ低級アルキル基を有していてもよいフェニルアルキル (アルキルの炭素数 1 ~ 2) 基; シンナミル基; 低級アルキル基; ピリジルメチル基; シクロアルキル (シクロアルキルの炭素数 3 ~ 6) アルキル基; アダマンタンメチル基; フルフリル基; 炭素数 3 ~ 6 のシクロアルキル基又はアシル基を意味する。 q は 1 又は 2 を意味する。

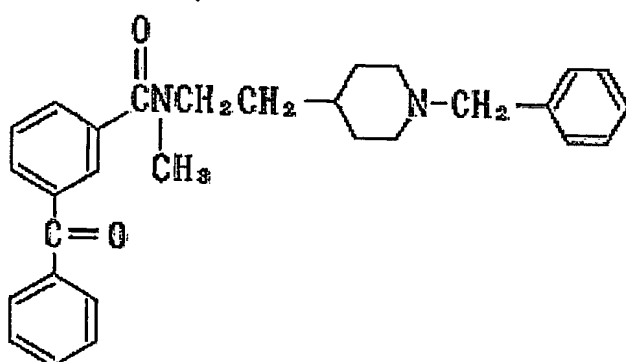
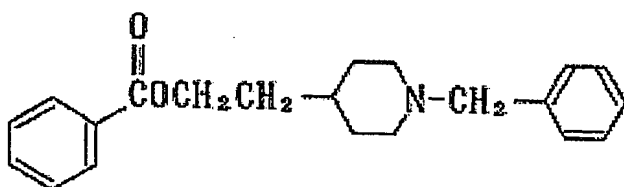
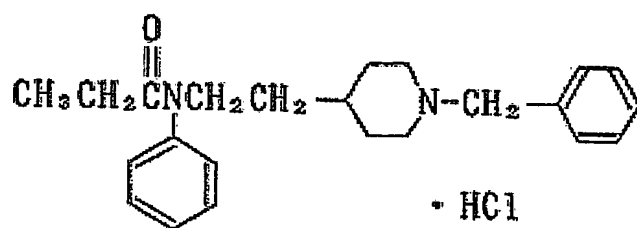
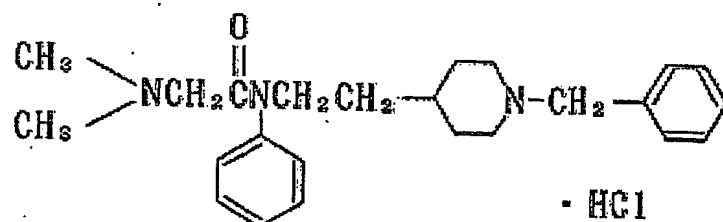
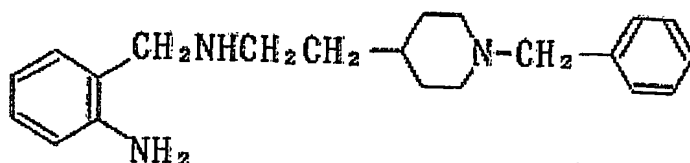
(vi) 次の一般式(I-2) で表される環状アミン誘導体又はその薬理学的に許容できる塩。

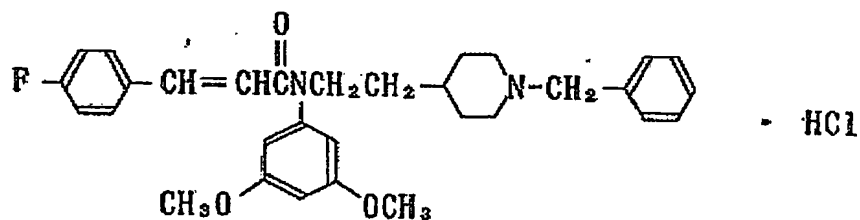
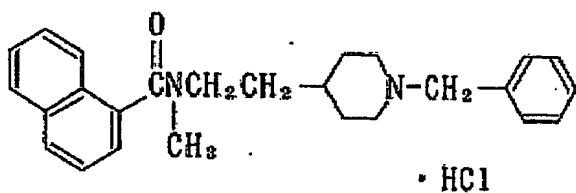
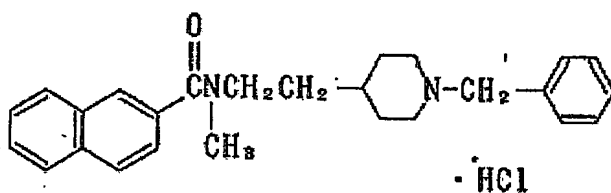
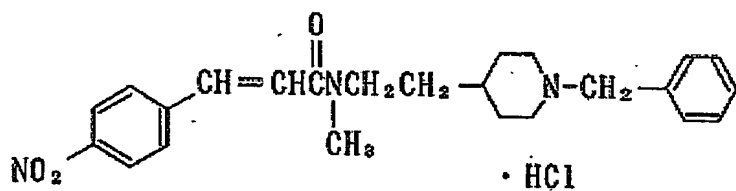
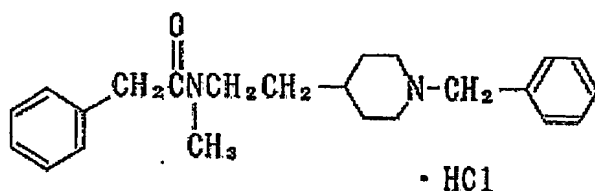
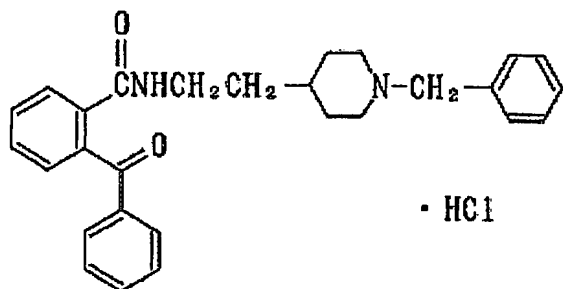


[式中、 J^{1-2} は置換基として炭素数 1 ~ 6 の低級アルキル基又は炭素数 1 ~ 6 の低級アルコキシ基を有してもよいインダノニル基を意味する。 T^2 は窒素原子を意味する。 B , K 及び q は前記の意味を有する。]

(vii) 下記式で表される化合物群から選択される環状アミン誘導体又はその

薬理的に許容できる塩。





4. 塩が塩酸塩である請求項3記載の予防剤及び／又は治療剤。

5. 神経細胞障害が、脳虚血、興奮性毒性またはAβ毒性によって誘発されるものである請求項3又は4記載の予防剤及び／又は治療剤。

6. 神経細胞障害が、脳卒中、脳梗塞または脳塞栓のいずれかに伴う脳虚血、興奮性毒性によって誘発されるものである請求項 3 又は 4 記載の予防剤及び／又は治療剤。
7. 興奮性毒性が NMDA 又はカイニン酸によるものである請求項 6 記載の予防剤及び／又は治療剤。
8. 神経細胞障害が、アルツハイマー病又はダウン症に伴う A β 毒性によって誘発されるものである請求項 3 又は 4 記載の予防剤及び／又は治療剤。
9. 細胞が脳由来の成熟した神経細胞である、請求項 1～8 のいずれか 1 項記載の剤。
10. 10. 神経細胞が、大脳皮質、中隔野及び海馬からなる群から選択されるいずれかに由来するものである、請求項 9 記載の剤。
11. 神経細胞が、初代培養細胞である請求項 9 又は 10 記載の剤。
12. 請求項 1 若しくは 2 記載の保護剤又は請求項 3 若しくは 4 記載の予防剤及び／若しくは治療剤を含有する、脳卒中、脳梗塞又は脳塞栓のいずれかの疾病の予後改善剤。
13. 請求項 1 又は 2 記載の保護剤の有効量を患者に投与することを特徴とする、中枢神経系の神経細胞保護方法。
14. 請求項 3 又は 4 記載の予防剤及び／又は治療剤の有効量を患者に投与することを特徴とする、中枢神経系の神経細胞障害の予防方法及び／又は治療方法。
15. 15. 神経細胞障害が、脳虚血、興奮性毒性又は A β 毒性によって誘発されるものである、請求項 14 記載の方法。
16. 興奮性毒性が NMDA 又はカイニン酸によるものである請求項 15 記載の方法。
17. 17. 神経細胞障害が、脳卒中、脳梗塞または脳塞栓のいずれかに伴う脳虚血または興奮性毒性によって誘発されるものである、請求項 14 記載の方法。
18. 18. 神経細胞障害が、アルツハイマー病又はダウン症に伴う A β 毒性によって誘発されるものである、請求項 14 記載の方法。

- 1 9. 請求項 1 2 記載の予後改善剤の有効量を患者に投与することを特徴とする、
脳卒中、脳梗塞または脳塞栓のいずれかの疾病の予後改善方法。
- 2 0. 請求項 1 又は 2 記載の保護剤、請求項 3 ～ 8 のいずれか 1 項に記載の予防
剤及び／又は治療剤、並びに請求項 1 2 記載の予後改善剤からなる群から選
5 択されるいずれかの剤を製造するための、請求項 1 又は 2 に示す化合物の使用。
- 2 1. 中枢神経系のコリン作動性神経細胞に、 $A\beta$ 存在下で候補化合物を作用さ
せ、 $A\beta$ 凝集量を検出または測定することを特徴とする、 $A\beta$ 凝集抑制作用を
有する化合物またはその薬理学的に許容される塩のスクリーニング方法。
- 10 2 2. $A\beta$ 凝集量の検出または測定結果を用いて、候補化合物が $A\beta$ 凝集抑制作
用を有するか否かを、候補化合物の非存在下における $A\beta$ 凝集量と比較する
ことで判定することを特徴とする、請求項 2 1 記載の方法。
- 2 3. 請求項 2 1 または 2 2 記載の方法に使用するための、 $A\beta$ 凝集抑制作用を
有する化合物またはその薬理学的に許容される塩のスクリーニングキット。
- 15 2 4. 中枢神経系のコリン作動性神経細胞に、 $A\beta$ 存在下で候補化合物を作用さ
せ、細胞傷害又は細胞死を検出することを特徴とする、 $A\beta$ 毒性によって誘
発される中枢神経系の神経細胞障害の予防及び／又は治療に有効な化合物
またはその薬理学的に許容される塩のスクリーニング方法。
- 2 5. 細胞傷害又は細胞死の検出結果を用いて、候補化合物が $A\beta$ 毒性に対する
20 細胞保護作用を有するか否かを、候補化合物の非存在下における細胞傷害又
は細胞死の程度と比較することで判定することを特徴する、請求項 2 4 記載
の方法。
- 2 6. 細胞傷害又は細胞死の検出が、乳酸脱水素酵素の濃度測定によるもの又は
MTT アッセイによるものである請求項 2 4 または 2 5 記載の方法。
- 25 2 7. 請求項 2 4 又は 2 5 記載の方法に使用するための、 $A\beta$ 毒性によって誘発
される中枢神経系の神経細胞障害の予防及び／又は治療に有効な化合物ま
たはその薬理学的に許容される塩のスクリーニングキット。

図 1

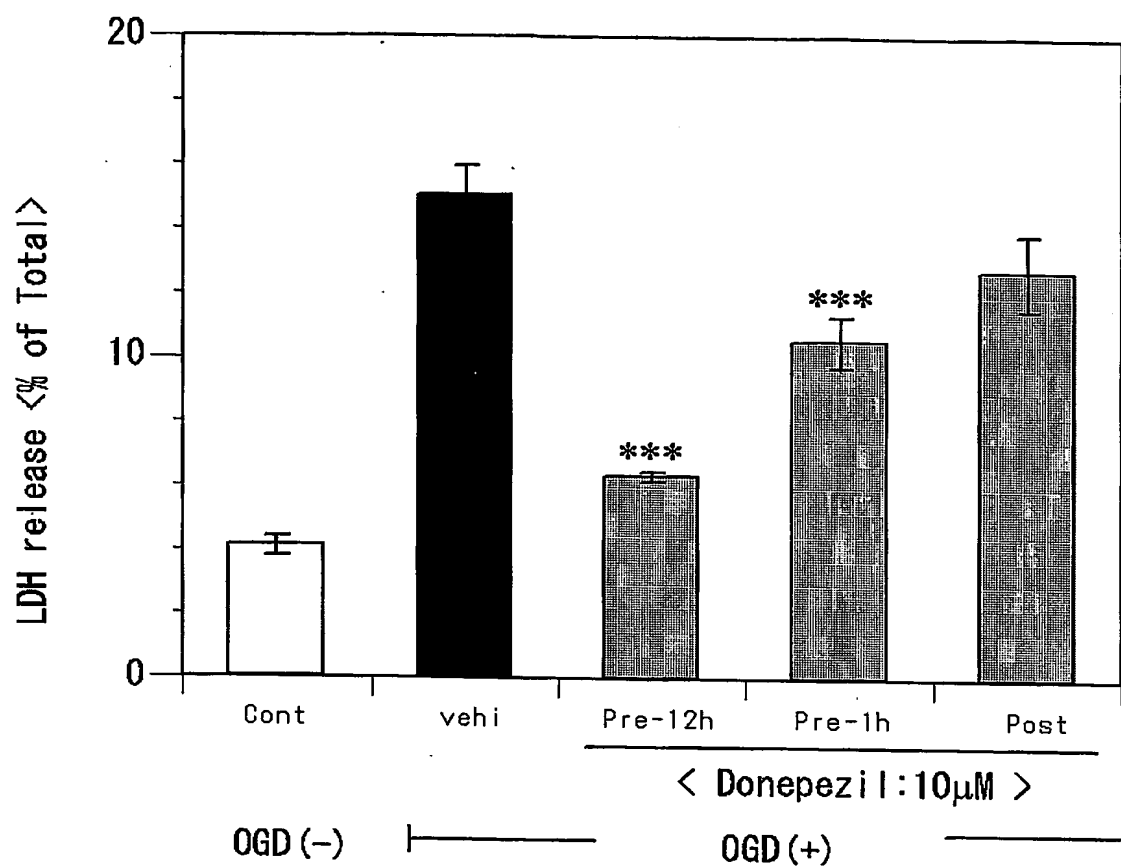


図 2

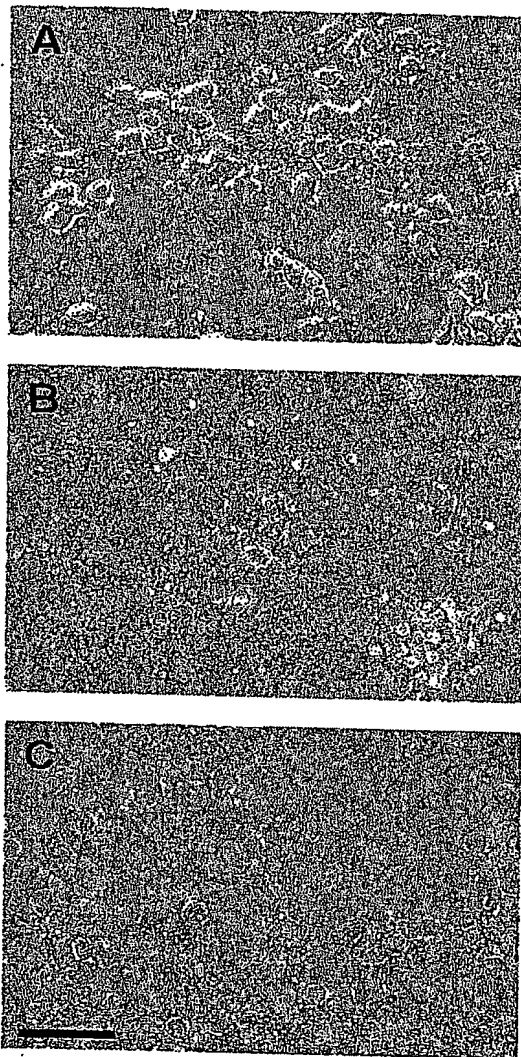


図3

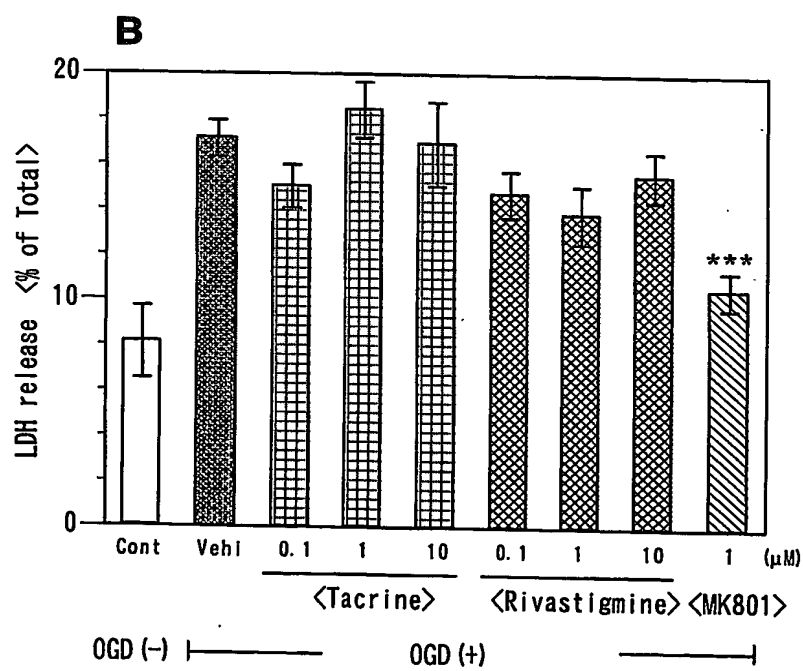
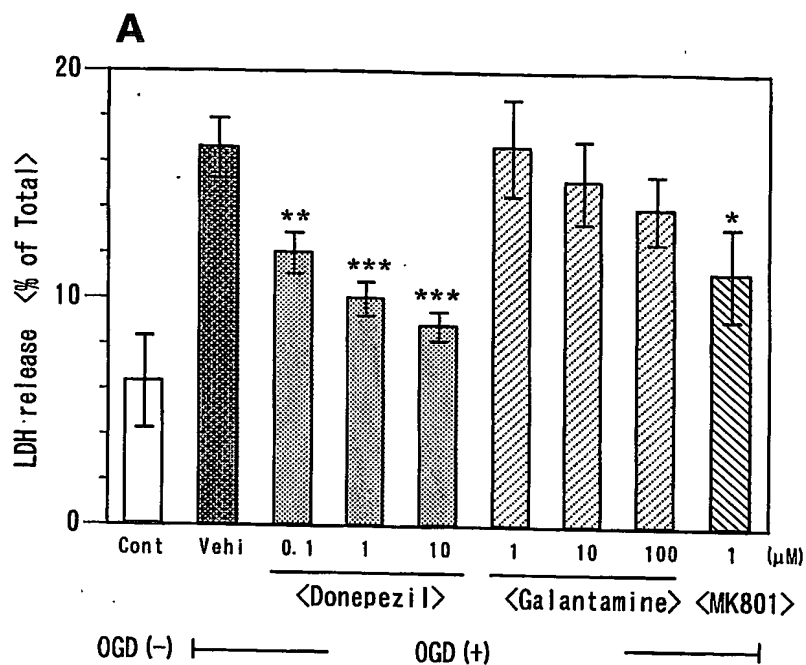


図 4

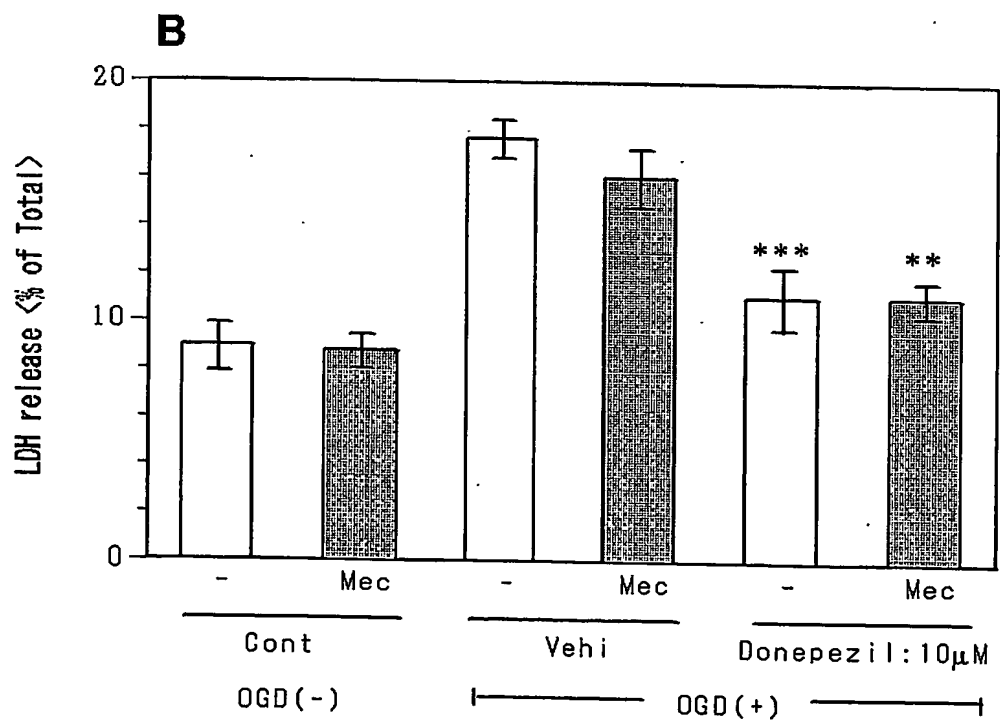
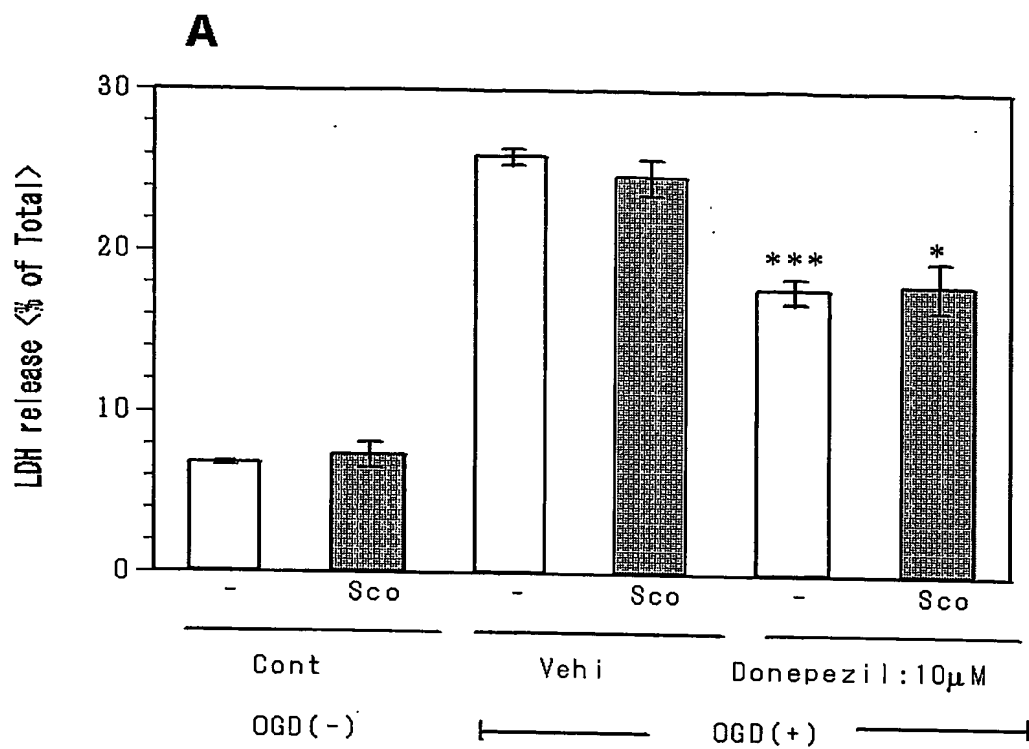


図5

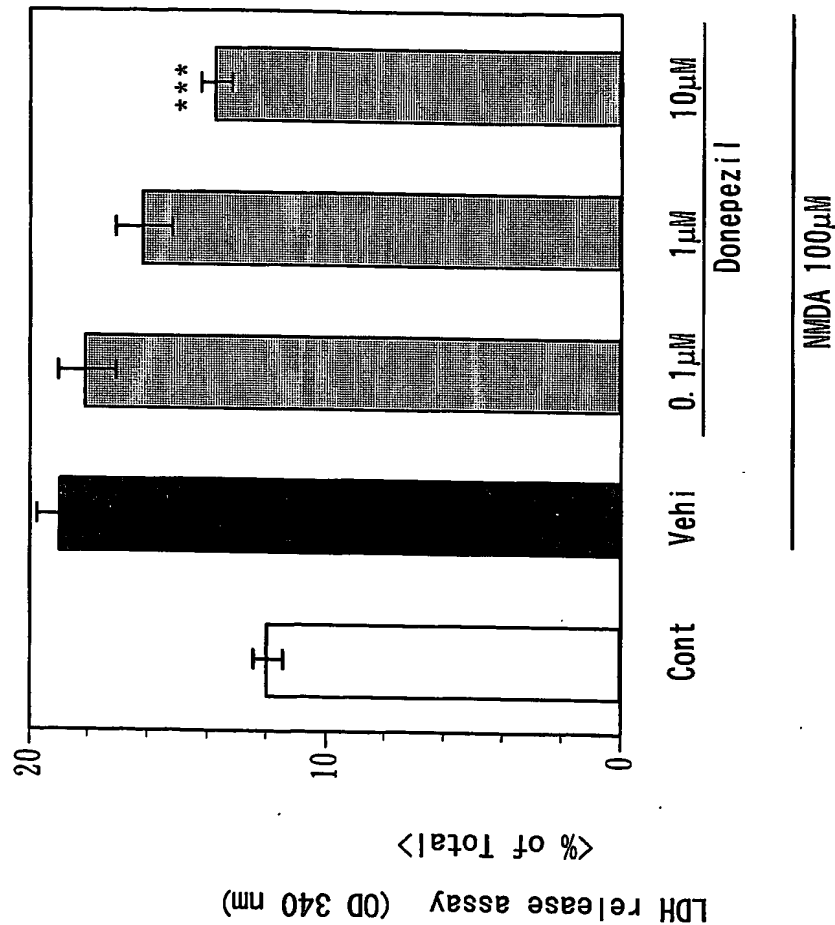


図6

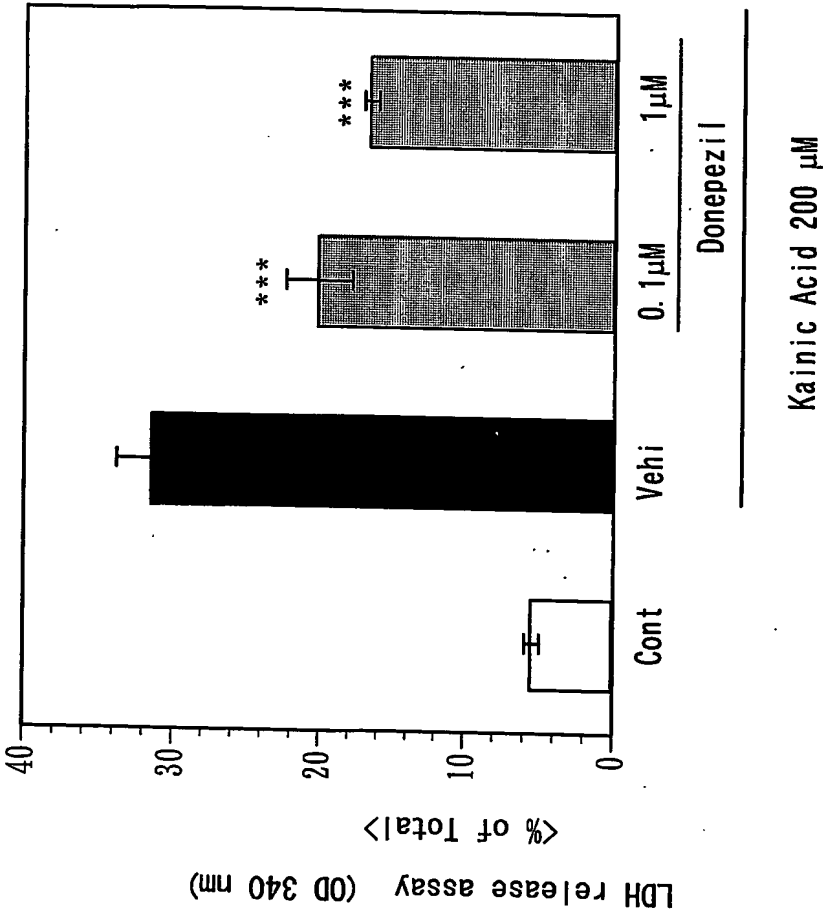


図 7

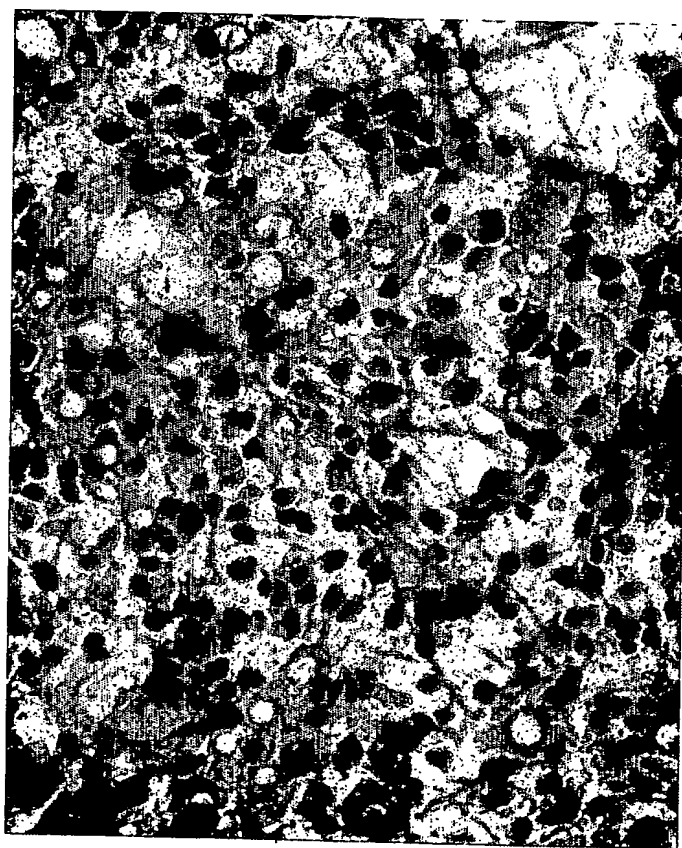


図8

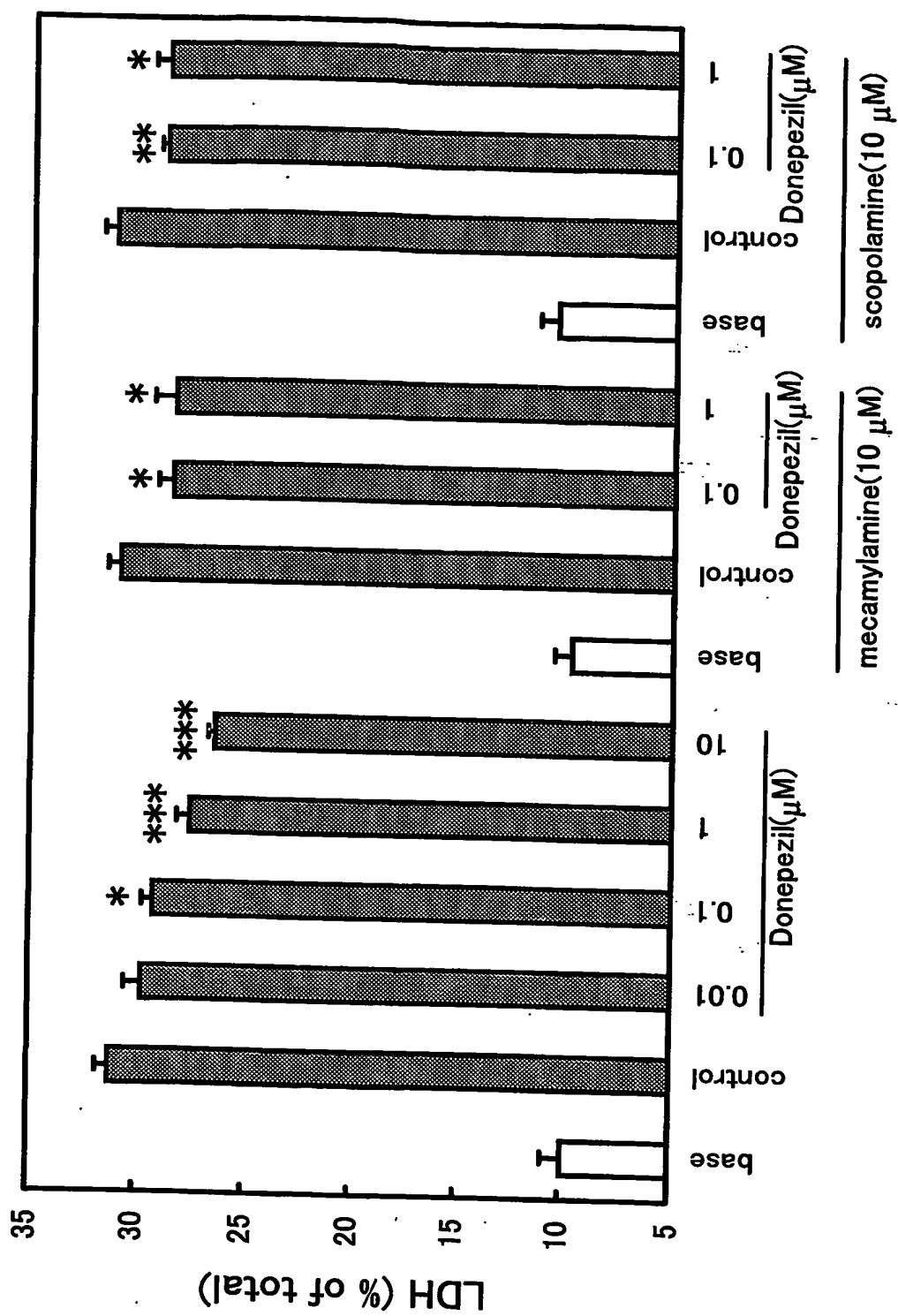


図9

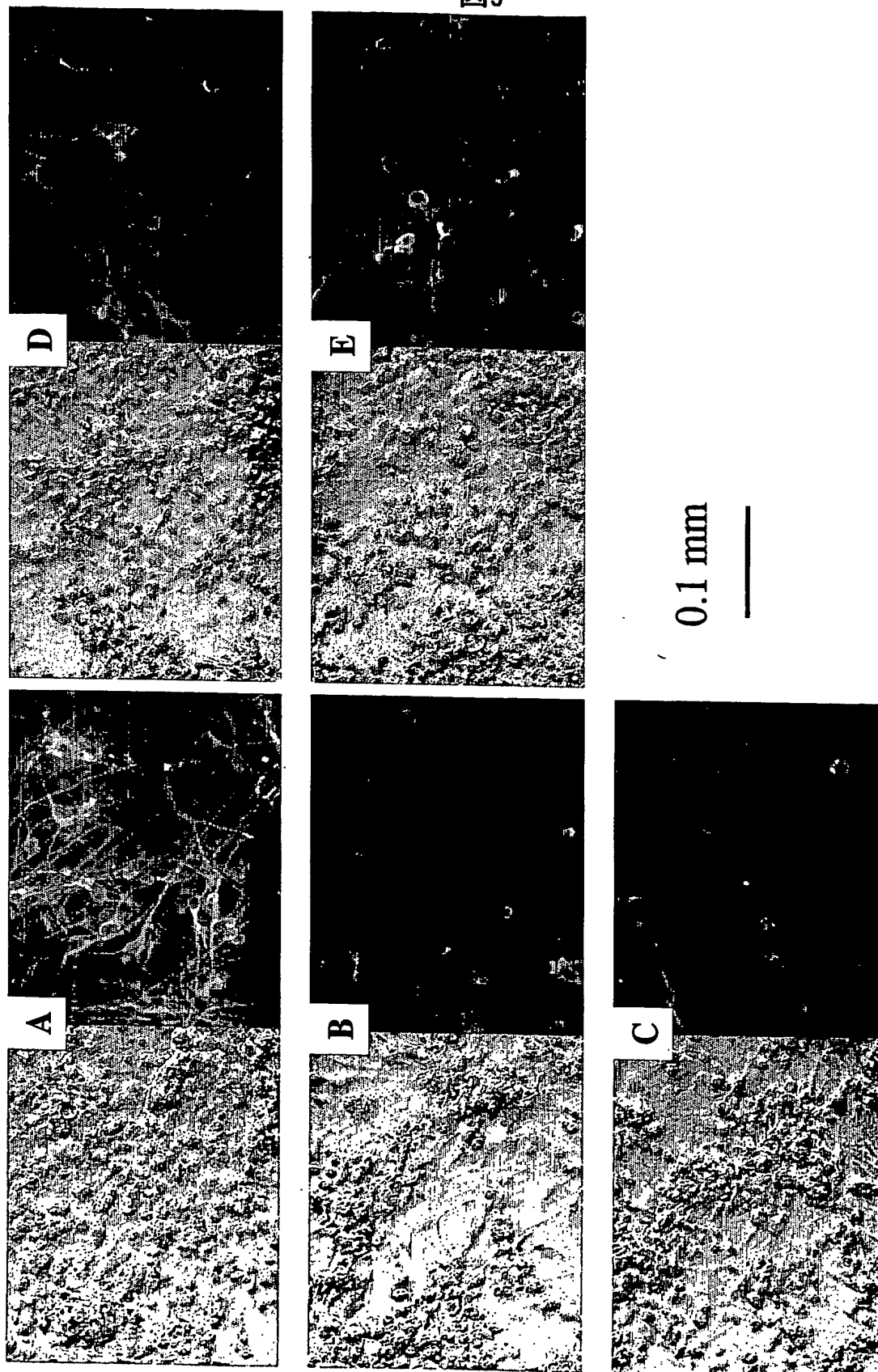


図10

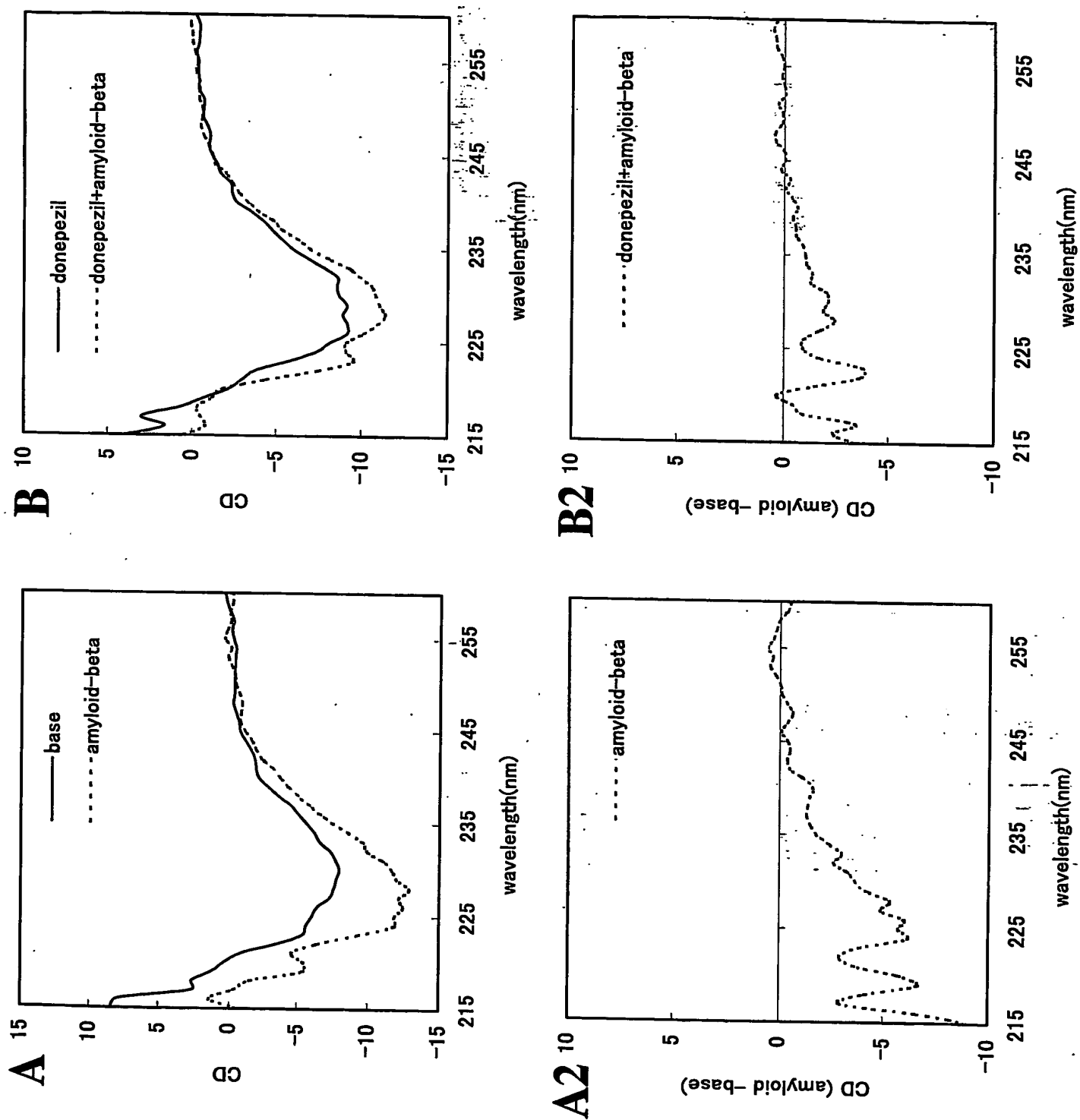


図11

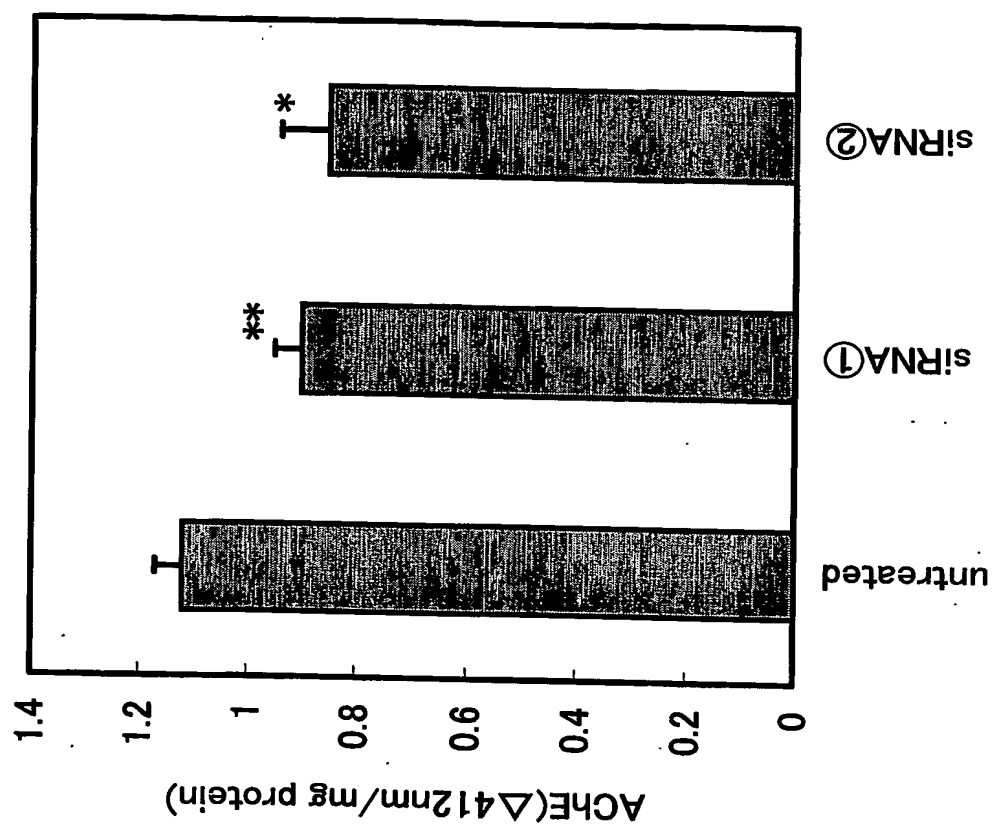


図12

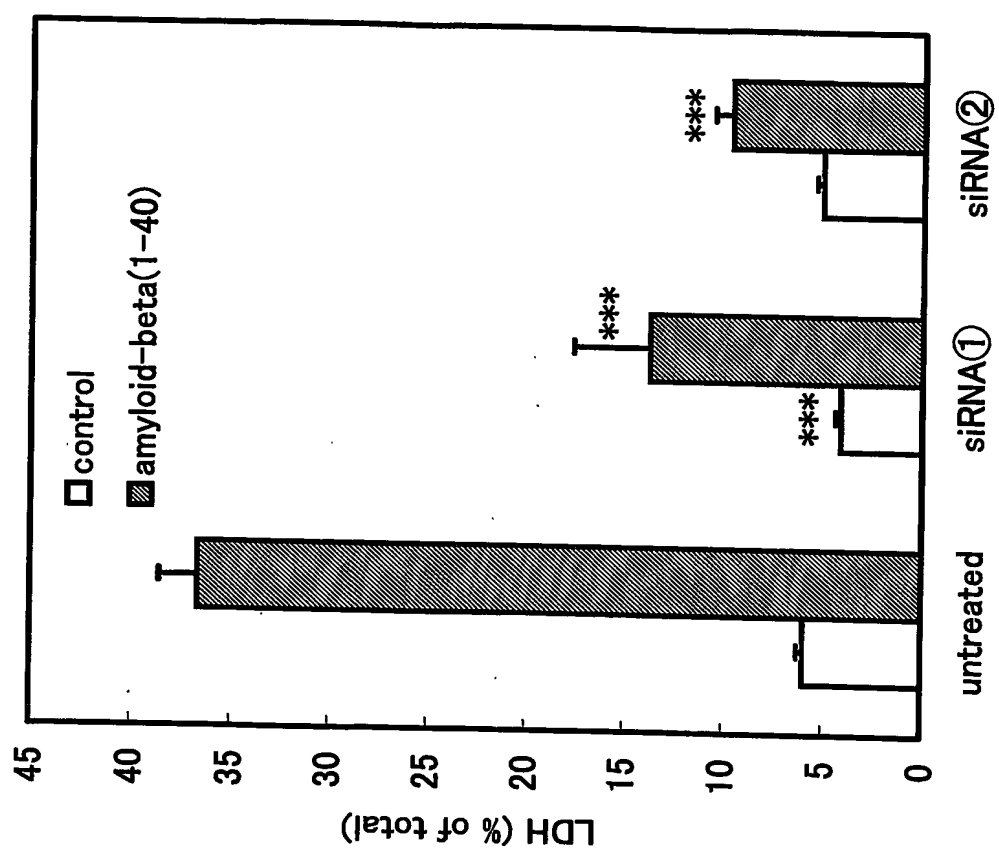
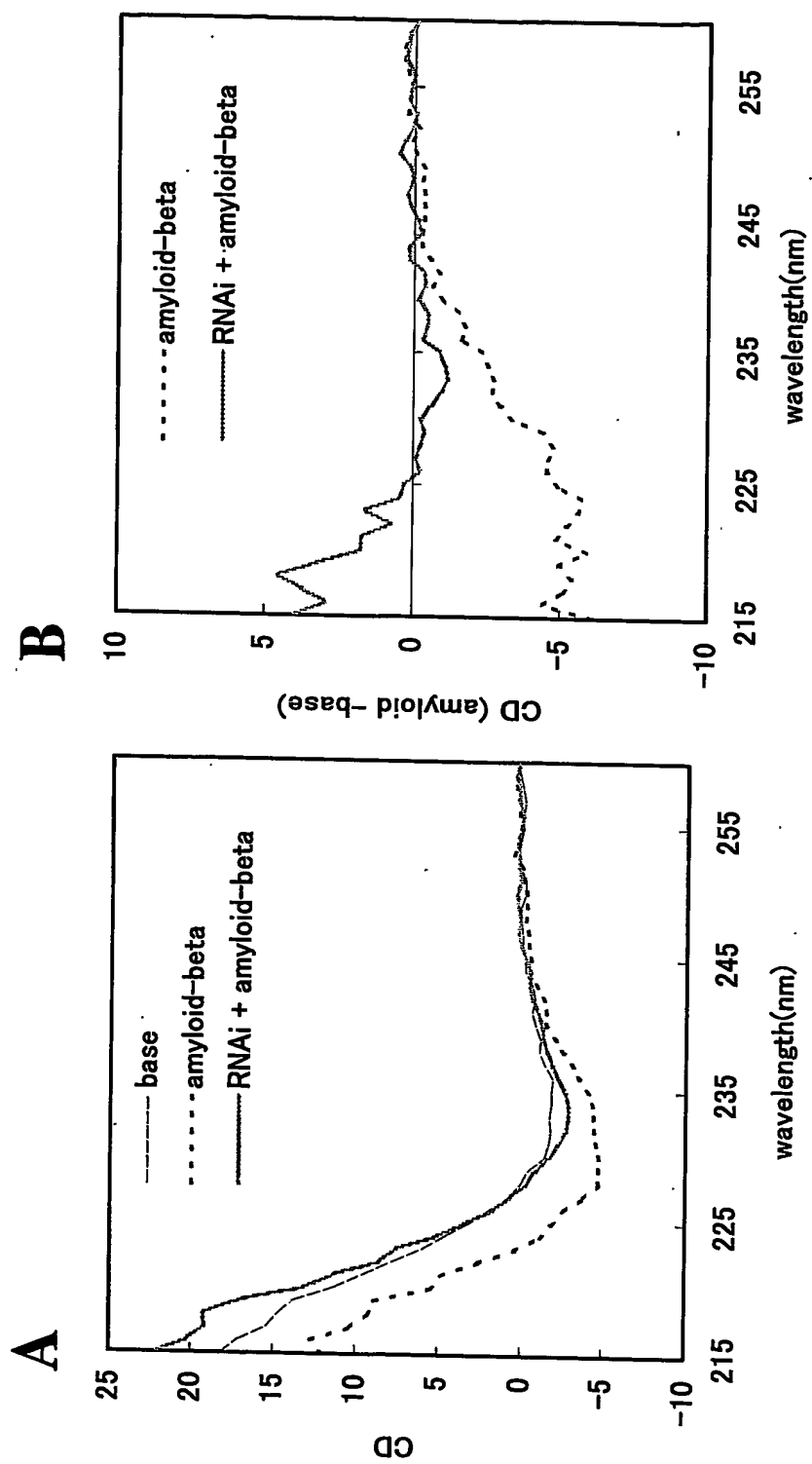


図13



SEQUENCE LISTING

<110> Eisai Co., Ltd.

<120> Inhibitor of amyloid beta aggregation

<130> P04-108PCT

<150> JP 2003-167744

<151> 2003-06-12

<160> 4

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA

<400> 1

aaugucagug acucuguuut t

21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA

<400> 2

aaacagaguc acugacauut t

21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA

<400> 3

gcugccucaa gaaaguauct t

21

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> siRNA

<400> 4

gauacuuucu ugaggcagct t

21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/008669

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K31/445, A61P25/00, G01N33/15, 33/50//C07D211/32

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K31/445, A61P25/00, C07D211/32

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
REGISTRY (STN), CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	XU, A. Jing et al., Effect of 3-[1-(phenylmethyl)-4-piperidinyl]-1-(2,3,4,5-tetrahydro-1H-1-benzazepin-8-yl)-1-propanone fumarate, a novel acetylcholinesterase inhibitor, on spatial cognitive impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion in rats, Neuroscience Letters, 2002, Vol.331, No.1, pages 33 to 36; Full text	1-12, 20

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
02 September, 2004 (02.09.04)

Date of mailing of the international search report
21 September, 2004 (21.09.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/008669

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 13-19
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The invention of claims 13-19 relates to methods for treatment of a human body by therapy.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

I. The special technical feature of invention of claims 1-12 and 20 relates to a neurocyte protective agent comprising a cyclic amine derivative such as donepezil hydrochloride.

II. The special technical feature of invention of claims 21-27 relates to a method of testing the neurocyte protective activity of candidate compound by causing the candidate compound to act on cholinergic neurocytes of central nerve system in the presence of A β .

(continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-12 and 20

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/008669

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

Thus, among the inventions of items I and II above, there is no technical relationship involving one or more of the same or corresponding special technical features. Consequently, it does not appear that these inventions are so linked with each other as to form a single general inventive concept.

<Subject of search>

Claims 1 to 3 relate to a therapeutic agent for neurocytes of central nerve system comprising any of compounds (i) to (vii), and the compounds (i) to (vii) cover a vast plurality of compounds. However, it appears that only the compound (i) (donepezil) is supported by the description within the meaning of PCT Article 6 and disclosed therein within the meaning of PCT Article 5.

Therefore, search has been conducted only on therapeutic agents for central nerve system comprising the compound (i).

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K31/445, A61P25/00, G01N33/15, 33/50
//C07D211/32

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61K31/445, A61P25/00, C07D211/32

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY (STN), CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN),
BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	XU, A. Jing et al., Effect of 3-[1-(phenylmethyl)-4-piperidinyl]-1-(2,3,4,5-tetrahydro-1H-1-benzazepin-8-yl)-1-propanone fumarate, a novel acetylcholinesterase inhibitor, on spatial cognitive impairment induced by chronic cerebral hypoperfusion in rats, Neuroscience Letters, 2002, Vol.331, No.1, p.33-36 全文参照。	1-12, 20

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02.09.2004

国際調査報告の発送日

21.9.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

中木 亜希

4 P

9282

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 13-19 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲13-19に記載された発明は、治療による人体の処置方法に関するものである。
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

I. 請求の範囲1-12及び20に記載された発明の特別な技術的特徴は、塩酸ドネペジル等の環状アミン誘導体を含む神経細胞保護剤に関するものである。

II. 請求の範囲21-27に記載された発明の特別な技術的特徴は、中枢神経系のコリン作動性神経細胞にA β 存在下で候補化合物を作用させ、該化合物の神経細胞保護作用を試験する方法に関するものである。

してみると、上記I及びIIの発明は、一又は二以上の同一又は対応する特別な技術的特徴を含む技術的な関係にないもので、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているものとは認められない。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。
請求の範囲1-12, 20

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

<調査の対象について>

請求の範囲1及び3は、(i)～(vii)で表されるいずれかの化合物を含有する、中枢神経系の神経細胞に対する治療剤に関するものであり、(i)～(vii)には非常に多数の化合物が包含される。しかしながら、PCT6条の意味において明細書に裏付けられ、また、PCT5条の意味において開示されているのは、(i)の化合物(ドネペジル)のみと認められる。

よって、調査は、(i)の化合物を含有する中枢神経系の治療剤について行った。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.